

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1922-1923

N°

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE LA

DIAZORÉACTION D'EHRLICH

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie)

Présentée et soutenue le

1923

PAR

Henri GUR

Pharmacien de 1^{re} Classe

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

JURY

MM. GRIMBERT, Président
BOUGAULT, Professeur
HÉRISSEY, Agrégé

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1923

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1922-1923

N°

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA
DIAZORÉACTION D'EHRLICH

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie)

Présentée et soutenue le

1923

PAR

Henri GUR

Pharmacien de 1^{re} Classe
Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

JURY

} MM. GRIMBERT, Président
BOUGAULT, Professeur
HÉRISSEY, Agrégé

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE
2, RUE CASIMIR DELAVIGNE, 2

1923

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, ,  I.
PERROT, *Assesseur*, ,  I.
G. DURSENT, *Secrétaire*, ,  I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut, ,  I. Botanique Générale.
VILLIERS, ,  I. Chimie analytique.
H. GAUTIER, ,  I. Chimie minérale.
RADAIS, ,  I. Cryptogamie et Microbiologie.
BEHAL, Membre de l'Institut, ,  I. Chimie organique.
PERROT, ,  I. Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, ,  I. Zoologie.
BERTHELOT, Membre de l'Institut,  I. Physique.
GRIMBERT, ,  I. Chimie biologique.
LEBEAU, ,  I. Pharmacie chimique.
DELÉPINE, ,  I. Hydrologie et Hygiène.
GUERBET,  I. Toxicologie.
BOUGAULT,  I. Pharmacie galénique.

Doyens honoraires : M. GUIGNARD, ,  I. et H. GAUTIER, ,  I.

Professeur honoraire : M. MOUREU, ,  I.

CHARGÉS DE COURS

MM. TASSILLY, ,  I. Minéralogie.
MARC HONNORAT, ,  I. Législation et Déontologie pharmaceutiques
LUTZ,  I. Cryptogamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET,  I.	MM. GUÉRIN,  I.	MM. LAUNOY,  ,  A.
DAMIENS,  A.	LUTZ,  I.	HERISSEY,  ,  I.
TASSILLY,  ,  I.	GORIS,  ,  I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ,  I. Chimie générale.
COUSIN,  I. Chimie analytique.
SOUÈGES,  I. Micrographie.
LEROUX,  I. Physique.
DEVAL,  I. Microbiologie.
FRANÇOIS,  I. Travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en chef : M. BARRAU-DIHIGO,  I.



A MON PÈRE

Pharmacien de 1^{re} Classe
Ancien Interne des Hôpitaux

MEIS ET AMICIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GRIMBERT

Membre de l'Académie de Médecine
Chevalier de la Légion d'Honneur

A MONSIEUR MEILLERE

Membre de l'Académie de Médecine

Pharmacien des Hôpitaux

Chevalier de la Légion d'Honneur

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ HÉRISSEY

Pharmacien des Hôpitaux

Chevalier de la Légion d'Honneur

A MES MAÎTRES DANS LES HOPITAUX

INTRODUCTION

Depuis 1882, de nombreux auteurs ont cherché à identifier dans les urines le corps qui est susceptible de donner la diazoréaction d'Ehrlich et ont émis sur ce sujet les avis les plus divers.

Pendant ce temps, les cliniciens ont appliqué cette réaction à l'identification de nombreuses maladies. Les uns lui ont accordé une valeur pronostique sûre, les autres l'ont considérée comme une réaction banale dépourvue d'intérêt.

Sans répéter tout ce qui a été dit sur ce sujet, nous avons repris la question en nous proposant de vérifier seulement les hypothèses les plus vraisemblables. Nous avons voulu voir si dans toutes les urines qui donnent par diazotation une coloration rouge, c'est toujours le même corps qui copule. Nous avons tenté de l'extraire, de l'identifier, de le doser. Nous avons terminé ce travail par un résumé succinct des cas dans lesquels nous avons rencontré la diazoréaction positive, sans cependant faire une statistique qui serait plus du domaine médical que chimique.

Nous avons entrepris ce travail sur les conseils du

docteur Meillère, Pharmacien-Chef de l'Hôpital Laënnec. Nous ne saurions trop le remercier de l'affectueuse sympathie qu'il nous a toujours témoignée et de la sollicitude toute paternelle avec laquelle il a guidé nos travaux.

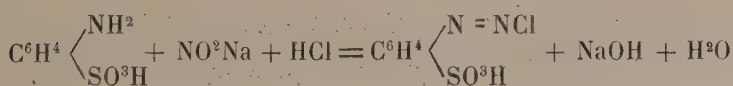
Le professeur Grimbert qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider cette thèse ne nous a pas non plus ménagé ses conseils, nous le prions de recevoir nos remerciements pour le bienveillant intérêt qu'il nous a témoigné.

Nous ne saurions trop remercier également Fleury, Préparateur à la Faculté de Pharmacie, Pharmacien Chef de l'asile de Vaucluse, dont l'appui nous a été si utile, ainsi que les médecins chefs de service et en particulier M. Auvray, professeur agrégé à la Faculté de Médecine, M. Ribierre, professeur agrégé de la Faculté de Médecine, M. Salomon, assistant du professeur Léon Bernard à l'hôpital Laënnec et les Internes en médecine des divers hôpitaux de Paris qui ont bien voulu nous accueillir si aimablement dans leurs services et faciliter ainsi notre travail.

I. — HISTORIQUE

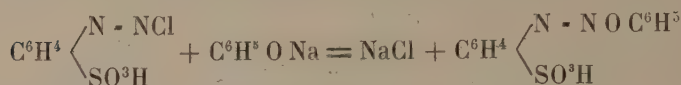
Au cours de ses travaux en 1882 Ehrlich eut l'occasion de rechercher dans les urines humaines la présence de substances appartenant à la série aromatique. Pour les identifier il se basait sur ce fait que les amines, en particulier, les amines qui dérivent des phénols c'est-à-dire des anilines, donnent naissance à des corps diazoïques quand elles sont traitées par l'acide nitreux, et que si l'on fait réagir sur cette solution de diazoïque une amine phénolique ou un phénol, on obtient avec une grande facilité un diazoïque généralement très coloré. Il lui suffisait donc de partir d'un diazoïque connu, de le mettre en présence de l'urine, puis d'alcaliniser, pour obtenir, au cas où l'urine contiendrait une substance aromatique, une coloration plus ou moins accentuée.

Pour atteindre ce but il mit en présence d'une solution aqueuse chlorhydrique d'acide sulfanilique, une solution étendue de nitrite de soude et obtint ainsi un sel de diazoïque, le chlorhydrate de sulfo-diazobenzol

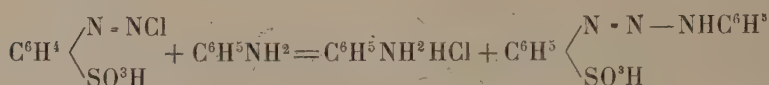


En faisant alors réagir sur cette solution de diazoïque l'urine qu'il voulait essayer il devait donc obtenir un diazoïque phénolé ou aminé selon les cas.

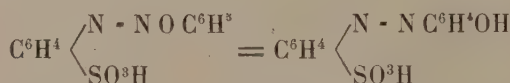
Soit par exemple dans le cas d'un phénol :



dans le cas d'une amine :



et le diazoïque phénolé devait donner par alcalinisation et transposition moléculaire un azoïque fortement coloré.



la même transposition se poursuivant pour le diazoïque aminé.

En opérant ainsi sur de nombreuses urines il constata que certaines d'entre elles donnaient dans ces conditions des colorations rouges plus ou moins foncées, tandis que d'autres se coloraient en jaune, jaune paille, jaune orangé.

Il fixa alors des conditions d'expériences très précises qui constituent encore actuellement la diazoréaction d'Ehrlich.

Pour faire la réaction, Ehrlich prescrivait de partir d'une urine fraîche, d'en prélever après agitation 5 cm³,

de les introduire dans un tube à essai et d'ajouter 5 cm³ de la solution suivante :

A	{	Acide sulfanilique	à saturation
		Acide chlorhydrique	50 gr.
		Eau distillée Q S	1000 »

puis V gouttes de la solution :

B	{	Nitrite de soude	1 gr.
		Eau distillée	100 »

d'alcaliniser ensuite légèrement par l'ammoniaque, d'agiter et d'observer la coloration du liquide et de la mousse. Pour lui, la réaction positive était donnée par 4 teintes rouges.

- RI : rouge orangé.
- R2 : rouge vermillon.
- R3 : rouge écarlate.
- R4 : rouge Bordeaux.

et dans tous les cas la mousse était colorée en jaune foncé, jaune rouge ou rouge.

Il étendit alors ses recherches à toutes les urines pathologiques qu'il put se procurer et remarqua que la réaction était principalement positive dans la fièvre typhoïde et la tuberculose, qu'elle était toujours négative dans les urines de sujets normaux. Il essaya vainement d'identifier le corps qui réagissait dans ces conditions. Il supposa que dans la tuberculose pulmonaire la réaction était due à la résorption des produits putrides formés par la destruction des globules de pus qui passe-

raient dans le sang ; mais dut par la suite abandonner son travail sans avoir pu déterminer nettement quelle était la cause de cette coloration.

Les doutes émis depuis ce jour et sur la nature du corps qui réagit, et sur les applications cliniques de cette réaction montrent les difficultés que l'on doit rencontrer pour identifier cette substance et prouvent que la réaction ainsi conçue n'est pas suffisamment précise pour s'appliquer à un corps défini, ou à un groupe de corps ayant vraisemblablement soit la même structure chimique, soit la même fonction.

C'est ainsi que les recherches ont amené de nombreux auteurs à des résultats différents, souvent même contradictoires. Il suffit de suivre l'histoire de ces travaux pour se rendre compte de la diversité des hypothèses émises et de leur peu de fondement.

En 1894 Nissen (57) puis Charles Lymann Greene en 1896 (33) confirmèrent la positivité de la réaction dans la tuberculose, la fièvre typhoïde, et montrèrent qu'elle est également fréquente dans la rougeole. Ils prétendirent qu'elle était due à la résorption des toxines microbiennes.

En 1896 Dolgoff (12) Rivier (49) Wessenberg (20) la rencontrèrent dans la pneumonie, la péritonite tuberculeuse, la tuberculose ganglionnaire, la pleurésie purulente, la fièvre typhoïde. Recherchant alors la nature du corps qui réagit, Dolgoff (12) montra qu'elle n'avait aucune origine locale, qu'elle absorbait le bleu et le violet du spectre, qu'elle précipitait par l'acétate de plomb ammoniacal et conclut qu'il s'agissait vraisemblablement d'un corps azoté de la série des sulfo-conjugés.

Quelques années plus tard Bénédict (20) attribua la réaction à la résorption des produits de la putréfaction intestinale, tandis que Geissler constatant que la diazo-réaction s'observait à la suite d'une destruction exagérée des leucocytes dans le sang, émit l'hypothèse que ces substances n'étaient pas formées dans le sang, mais prenaient seulement naissance au moment du passage des produits de putréfaction des leucocytes au travers du rein.

En 1903 Monfet (42) chercha activement à identifier le corps « diazoréactionnant » et montrant que la réaction était due à une exagération des dérivés aromatiques sulfo-conjugés sans que les dérivés sulfo-conjugés de l'indol et du scatol ne prennent part à la réaction, comme il avait cru tout d'abord (43). Hypothèse que Maillard vérifia et confirma la même année (37). Il déféquait l'urine au sous-acétate de plomb ammoniacal, filtrait, essorait le précipité et le traitait par un léger excès de solution d'acide tartrique. Le tout était filtré à nouveau, le filtrat récupéré, décomposé par le carbonate de potasse, filtré, et le liquide précipité par le chlorure de baryum.

Il redécomposait le précipité, répétait la même opération, démontrait l'absence de soufre, et l'analogie du corps qu'il avait obtenu avec une solution de phénol sulfate de potasse.

En répétant cette technique il nous a été impossible de précipiter la substance qui diazoréagit par BaCl_2 , et il semble que Monfet soit parti d'une urine contenant un corps autre que celui qui a donné des colorations à Ehrlich, puisqu'il prétend que chez un sujet normal, la

diazoréaction devient positive après deux jours de régime carné, et qu'une urine positive devient négative après deux jours d'un régime végétarien ou lacto-végétarien. Ce qui laisserait supposer que la réaction est inexistante dans la fièvre typhoïde, puisque ces malades sont généralement soumis soit à ces régimes, soit à un jeûne absolu.

Dès 1914 la diazoréaction connut alors une grande vogue et les hypothèses émises sur la nature de la substance qui réagit furent presque aussi nombreuses que les auteurs qui se sont occupés de la question.

Parmi les plus sérieuses, on peut retenir les travaux de Clémens de Fribourg qui voit dans le corps une substance azotée provenant de la décomposition des albumines (9), ceux de von Bogaert (56) qui attribuent la réaction à l'indican (Maillard démontra le contraire) (137) et à l'urohématine.

Or l'urohématine est un pigment ferrugineux qui donne en solution alcaline ou acide des spectres caractéristiques que nous n'avons jamais obtenus dans nos solutions les plus purifiées.

D'autres comme Boschi (14) et Ghelfi (22); se basant sur les colorations variées qu'ils obtenaient dans les urines de sujets sains, émirent alors l'idée que la diazoréaction était donnée par une substance normale de l'urine dont l'augmentation serait la cause de la réaction.

Jackst (30) attribua la réaction à l'acétone. Or si une solution impure d'acétone donne la réaction, il n'en est pas de même d'acétone pure, et Noortheen, reprenant la question, prétendit avoir affaire à l'acide acétyl-acétique

qui cependant n'entre en rien dans la diazoréaction comme nous le montrerons plus loin.

La même année Nicola (46) remarquant la présence simultanée dans quelques urines de la diazoréaction et de la tyrosine, concluait nettement que la diazoréaction était donnée par ce corps. Hypothèse toute gratuite car nous avons trouvé des urines contenant de fortes quantités de tyrosine qui ne donnaient pas du tout la diazoréaction. De plus, en extrayant la tyrosine par sublimation selon le procédé d'Ulrich, et en la purifiant par plusieurs sublimations successives, nous avons obtenu un produit qui ne nous donnait nullement la réaction, bien que donnant d'une façon certaine tous les caractères et toutes les réactions de la tyrosine. En essayant de dégrader la tyrosine par le coli bacille suivant la méthode de Orheim (47) nous ne sommes arrivé à aucun résultat. La solution donnait bien la diazoréaction, mais se colorait alors en rouge par le perchlorure de fer.

Quelques années plus tard vers 1907, Moritz-Weiss (60) étudia la diazoréaction dans les urines et l'attribua à l'urochrome. Il rattacha la matière colorante des urines au groupe des acides oxyprotéiques, prétendant que la diazoréaction était donnée par 2 chromogènes qui proviendraient l'un et l'autre des acides autoxyprotéiques et alloxypotéiques. Il établit même une nouvelle réaction, la réaction au permanganate de potasse, beaucoup plus sensible. Réaction qui consistait à ajouter quelques gouttes d'une solution de permanganate au millième dans l'urine fraîche acide, diluée au tiers. La réaction est dite positive quand l'urine prend une colo-

ration jaune plus ou moins foncée. Pour lui cette réaction était due, comme celle d'Ehrlich à l'oxydation de l'urochromogène et à sa transformation en urochrome. Bien plus, la réaction permettrait de mettre en évidence un urochromogène qui n'est pas mis en évidence dans la réaction d'Ehrlich : d'où supériorité en simplicité et précision. Il montra enfin le rapport étroit qui existe entre la destruction des albumines des tissus et l'excrétion des acides protéiques, ainsi que le rapport qui existe entre l'élimination du soufre neutre et la positivité des deux réactions (61). Nous aurons d'ailleurs l'occasion de revenir plus loin sur ces travaux.

En 1908 Engeland (17) montra que la coloration se produit dans une urine normale additionnée de soude si le réactif est lui-même additionné de soude. Il prétendit que la réaction était due aux premiers stades d'oxydation de la tyrosine : à l'acide paraoxyphenylpropionique, et à l'acide paraoxyphénylacétique, corps possédant un noyau imidazoïque ; il isola même deux corps : l'acide amino-imido-azolpropionique et l'acide amino-imidoazolacétique.

Nous avons réalisé la préparation de l'histidine en hydrolisant l'hémoglobine par l'acide chlorhydrique, puis en l'isolant par combinaison avec le bi-chlorure de mercure que nous avons ensuite éliminé par l'hydrogène sulfuré. La solution aqueuse de ce corps ne nous donnait nullement la diazo-réaction, mais une coloration orangée non spécifique. C'est ainsi que nous avons pu nous rendre compte qu'Engeland semblait avoir perdu

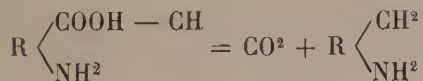
de vue la coloration rouge, la mousse rouge, le précipité vert si caractéristique de la diazoréaction véritable.

En 1913 K. Féri (19) publia une nouvelle méthode de recherche du corps qui réagit, en employant au lieu de sulfo-diazobenzol, le rouge azophor P. N. ou para-nitrodiazobenzol.

Il délayait quelques grains de rouge azophor P. N. dans 4 à 5 cm³ d'eau, ajoutait quelques gouttes de cette solution à 10 cm³ d'urine alcalinisée fortement jusqu'à trouble léger, et observait la coloration. Pour lui la réaction positive était rouge, la négative brune et sa réaction était supérieure à celle d'Ehrlich, grâce à l'appréciation plus facile de la coloration rouge. Pour lui ni la bilirubine, ni l'albumine, ni le glucose, ni les phénols n'étaient susceptibles de gêner la réaction, et pour les distinguer, il ajoutait à l'urine un peu d'acide acétique qui faisait disparaître les fausses colorations, tandis que celle due au chromophore d'Ehrlich subsistait.

En 1913 un italien, Armando Rossi, montra que souvent dans l'urine des typhiques il y a un rapport entre la positivité de la diazoréaction et la présence de l'acide acétyl-acétique, que cependant on peut trouver une diazoréaction positive sans acide diacétique et vice-versa.

D'autres comme Pelissier (48) prétendirent que la diazoréaction était due à la présence dans l'urine de tyrosamines provenant de la décarboxylation de la tyrosine; hypothèse toute gratuite et qui n'est basée sur aucun fait précis.



A la même époque parut enfin la réaction au bleu de méthylène de Russo, mais elle fut immédiatement abandonnée à la suite des travaux de Bonin et Lartigault (2) qui montrèrent nettement que dans certains cas graves, particulièrement dans la tuberculose trachéale ou intestinale la réaction était positive, alors que dans certains cas de tuberculose mortels, la réaction demeurait négative; qu'elle était positive, avec l'urobiline, l'urobilinogène, l'urochrome et surtout avec les pigments biliaires. Ils constatèrent également comme d'autres expérimentateurs que la coloration verte qui en suivait l'évolution clinique en marquait les rechutes et les complications, mais qu'elle apparaissait aussi au début de la plupart des maladies, surtout au cours des affections dans lesquelles l'urine est très colorée.

En 1919 Mazoin (39) prétendit qu'une réaction positive était un indice d'un trouble de l'élimination urinaire et que la maladie consistait en un trouble du métabolisme des cellules.

La même année Furth (18), en 1920 Guth (23) cherchèrent à isoler le corps « diazoréactionnant » par précipitation barytique. La fraction barytique fut séparée par précipitation fractionnée avant et après hydrolise, et à chaque fraction étudiée séparément. Ils conclurent que le produit qui réagit, bien que non identique à l'histidine, est en rapport très voisin avec ce dérivé et qu'il consistait en un produit de transformation ou de condensation de l'histidine. Pour eux le chromogène est thermostable, soluble dans l'alcool, et ne peut être que très difficilement précipité de sa solution alcoolique par

l'acétone. En répétant sa technique opératoire il nous a été impossible de précipiter par Ba Cl^2 la substance qui diazoréactionne et nous avons dû abandonner une fois encore cette hypothèse.

En 1921 Hermann et Sachs (28) tentèrent l'extraction du corps qui réagit par distillation, solubilisation par l'éther, cristallisations successives, et isolèrent un composé qui aurait pour formule $\text{C}^{16}\text{H}^9\text{O}^2\text{N}$.

Nous avons encore une fois tenté de répéter ce mode d'extraction que nous avons dû abandonner devant l'insuffisance des résultats. Reprenant leur travail, Hermann et Sachs (28) isolèrent alors la substance de l'urine des tuberculeux, alors qu'elle était en combinaison avec le dichloro-azo-benzène. Ils concentraient l'urine au 1/5, filtraient, déféquaient par le sous-acétate de plomb, filtraient, précipitaient dans ce filtrat l'excès de plomb par H^2S et filtraient de nouveau. Ils englobaient alors la substance en milieu alcalin avec le dichloro-azo-benzène, extrayaient le colorant par un mélange d'éther et de pyridine. Après décomposition et identification ils conclurent alors que la diazoréaction était donnée par l'acide hydroxy-indolacétique.

Weiss (62) reprenant encore une fois la question en 1922 montra que la réaction était donnée par l'urochrome et l'urochromogène.

D'après la multiplicité des travaux qui ont été faits sur la question au point de vue chimique. D'après la multiplicité des opinions et des résultats, il est facile de se rendre compte que beaucoup d'auteurs ont identifié des corps autres que celui qui donnait à Ehrlich la diazoréac-

tion, et cela uniquement parce que la réaction elle même était mal définie.

C'est ainsi que pendant toute cette époque on appelait diazoréaction positive dans l'urine tantôt une coloration rouge, tantôt une coloration orangée et souvent sans s'occuper si la coloration répondait toujours aux mêmes caractères fixes, invariables ou simplement si l'urine contenait des corps médicamenteux quelconques.

Partant alors de réactifs variés, Ehrlich, Weiss, Russo, Feri, admettant comme positives des colorations rouges orangées, parfois jaunes, les auteurs devaient trouver des corps différents en cherchant à identifier le corps qui réagit. Ils devaient également trouver cette réaction fréquemment dans les urines, et la fréquence de sa positivité lui devait enlever une grosse partie de sa valeur. N'ayant plus de valeur pour la clinique, la diazoréaction tomba dans l'oubli.

II. — TECHNIQUE EMPLOYÉE

Ne pouvant nous baser sur tous les travaux faits jusqu'alors puisque les avis étaient si contradictoires, nous avons tout d'abord cherché à définir la réaction en reprenant le travail là où Ehrlich l'avait laissé : c'est-à-dire en cherchant si la coloration rouge qui se produit par diazotation est toujours due à un seul et même corps, si cette réaction est absolument spécifique de certaines maladies, si cette substance peut être identifiée, et si sa présence peut avoir une signification quelconque au cours des maladies où on la rencontre.

Pour réaliser ce but il importait avant tout de partir de réactifs toujours identiques et d'opérer dans les mêmes conditions pour obtenir des colorations qui correspondent toujours à la même quantité déterminée d'urine.

Pour pratiquer la réaction nous avons toujours employé trois réactifs.

Solution A.	{	Acide sulfanilique	8
		Acide chlorhydrique	50
		Eau distillée	1000

Solution B. {	Nitrite de soude	1
	Eau distillée.	100

Ammoniaque pure : (Codex 1908) à 22 % Q S.

Nous opérons de la façon suivante : nous versions dans un tube à essais d'un diamètre connu, cinq cm³ de solution A, cinq gouttes de solution B, 5 cm³ d'urine à essayer puis enfin 2 cm³ d'ammoniaque.

La réaction doit être faite à froid, rapidement car le chlorhydrate de sulfo-diazobenzol s'altère facilement et la réaction deviendrait négative ; de plus il importe de ne pas opérer inversement comme l'indiquent certains auteurs (Ronchèse) (57) c'est-à-dire de verser la solution chlorhydrique dans l'urine puis d'ajouter la solution de nitrite de soude, car, si l'urine était fortement ammoniacale, la réaction bien que positive demeurerait négative. L'acide chlorhydrique de la solution A étant immédiatement neutralisé par l'ammoniaque urinaire libre et la décomposition du nitrite de soude en acide nitreux deviendrait impossible.

La réaction ne pourrait donc se faire.

C'est ainsi que de nombreux auteurs ont cru que la substance « diazoréactionnante » était détruite par la fermentation ammoniacale alors qu'en réalité il n'en est rien. Nous avons essayé des urines bleuissant nettement le tournesol, dont la décomposition était avancée, qui donnaient une réaction aussi intense que le premier jour, surtout si elles avaient été soustraites à l'action de l'air libre.

Après avoir opéré sur de nombreuses urines prove-

nant tantôt de sujets sains, tantôt de malades tuberculeux, typhiques, rougeoleux, etc., nous avons pu constater au cours de ces réactions que nous obtenions des colorations allant du jaune paille au rouge brun foncé, et que la coloration rouge ne se produisait jamais dans l'urine de sujets sains.

III. — DIAZORÉACTION DANS L'URINE NORMALE

En essayant par cette méthode près de 150 urines différentes de sujets bien portants dont quelques-uns étaient volontairement soumis à des régimes variés, nous avons constaté que la coloration variait entre le jaune paille et le jaune rouge, que le régime végétarien portait la couleur de l'azoïque formé vers le jaune paille, tandis que le régime exclusivement carné la faisait virer au jaune rouge sans jamais cependant atteindre le rouge.

Nous nous sommes alors demandé si, comme l'avait vu Monfet (42), la diazoréaction n'était pas donnée par un constituant normal ou anormal connu de l'urine dont l'excès réagirait sur le sel de diazoïque. Il nous a paru alors intéressant de chercher quels pouvaient être les corps susceptibles de donner cette coloration. En analysant d'une façon aussi complète que possible l'urine de mêmes sujets sains soumis au régime végétarien puis au régime carné, nous avons constaté qu'il y avait un rapport étroit entre l'augmentation de l'intensité de la coloration et l'augmentation de l'urée, de l'azote urinaire total, de la créatinine et surtout de l'in-

dosé urinaire. En employant la technique indiquée par Ronchèse (51). (Indosé = extrait organique total — N total $\times$ 2).

En opérant sur des urines pathologiques nous avons trouvé également qu'il y avait une relation entre la coloration et la présence dans ces urines de tyrosine, d'acétone et de pigments biliaires.

Pour vérifier l'exactitude de ces réactions nous avons opéré sur ces corps purifiés en solution aqueuse.

Dans ces conditions une solution d'urée à 25 grammes par litre donne une coloration jaune paille ; tandis que la tyrosine, la créatinine, les albumines et les pigments biliaires donnent par diazotation des colorations plus foncées allant jusqu'au brun, sans cependant que le mélange de ces teintes ou une grosse quantité d'un de ces corps puisse donner une coloration rouge.

Dans les urines qui ne donnent pas la réaction, la présence de l'urée, de la créatinine ou de très faibles quantités de pigments biliaires suffit donc seule à expliquer la coloration que prennent ces urines sous l'influence du réactif.

IV. — COLORATION DE CERTAINES URINES

A côté de toutes ces colorations variant du jaune à l'orangé nous avons constaté chez des sujets atteints de fièvre typhoïde, de rougeole, de tuberculose, de glycosurie, ou de maladies peu définies, que l'azoïque qui se formait dans la réaction, était d'un rouge plus ou moins intense, que la mousse après agitation était persistante, colorée, et que 24 heures après la réaction il se formait parfois un précipité verdâtre au fond du tube ; caractères qu'Erlich admettait comme ceux d'une urine positive.

Ne connaissant aucune des réactions du corps que nous cherchions à caractériser et voulant savoir si tous ces azoïques rouges provenaient de la copulation d'une seule et même substance, nous avons essayé sur un grand nombre d'urines l'action de la chaleur, des principaux sels neutres, ou de tous les corps susceptibles de modifier la substance sans cependant entraver la diazotation en elle-même.

1° Nous nous sommes alors aperçus que certaines urines médicamenteuses donnent la réaction, mais que dans tous ces cas, l'urine se colore directement par addition d'une goutte de perchlorure de fer.

2° Que certaines urines donnent un azoïque coloré en rouge, mais que si l'on sature l'urine par le sulfate de magnésie et que l'on filtre, on obtient alors après diazoréaction une coloration rouge brun d'une intensité beaucoup plus accentuée ; parfois si accentuée qu'il est alors nécessaire de diluer la solution par deux volumes d'eau pour percevoir la coloration rouge. Dans ces urines, la substance est rapidement détruite par la chaleur et surtout après saturation par le sulfate d'ammoniaque à l'ébullition, tandis que dans les mêmes conditions expérimentales la substance diazoréactionnante subsiste intégralement.

3° Nous avons constaté également que nous obtenions toujours après diazotation dans les urines tuberculeuses, typhiques, rougeoleuses, un azoïque coloré en rouge bien plus stable à la chaleur, sur lequel le perchlorure de fer n'a aucune action et le sulfate de magnésie aucun effet.

1° ACTION DES MÉDICAMENTS INGÉRÉS

Après avoir constaté que certains médicaments provoquent par diazotation une coloration rouge dans les urines, nous nous sommes attachés à faire expérimentalement sur des sujets donnant ou ne donnant pas de réaction, l'essai de différentes substances pharmaceutiques capables de provoquer la réaction dans les urines, d'en augmenter l'intensité ou de la détruire.

Le tannin, comme l'a démontré Masoin (29) puis

Bonnes (5), empêche la réaction aussi bien *in vitro* que dans l'urine après ingestion d'un à deux grammes par jour. Son action inhibitrice chez plusieurs sujets qui présentaient une réaction intensive s'est exercée pendant 3 à 4 jours après l'absorption.

Urotropine, le formol n'entravent nullement la réaction comme l'avait prétendu Cavaudan (8).

Morphine, Héroïne, Naphtaline, ne sont pas susceptibles de provoquer dans l'urine une coloration rouge par diazotation. Scrapitti l'avait déjà démontré chez les animaux en 1905 (54).

Chez des malades auxquels on faisait par piqûres des doses de morphine allant de 0,05 à 0,30 par jour nous n'avons jamais constaté la diazoréaction dans les urines. Une héroïnomanie qui absorbait journellement 1 gr. 80 d'héroïne n'a jamais présenté de réaction positive. 2 gr. de naphtaline ne donnent pas de réaction comme le prétendait Képhalinos (31) et ne sont pas susceptibles d'entraver la diazoréaction.

Les corps qui donnent une diazoréaction positive dans l'urine après ingestion sont rares, ce sont tous les phénols dont la fonction reste libre dans l'urine, qui donnent par conséquent une coloration accentuée par le perchlorure de fer. Parmi ceux-ci nous avons rencontré le phénol, la créosote, l'acide salicylique, le gaïacol, la phloroglucine, le thymol, la santonine. Les dérivés anthraquinoniques, la phénolphtaléine, l'antipyrine faussent également la réaction. L'attention est immé-

diatement attirée, et il est impossible de confondre ce corps avec la véritable diazoréaction d'Ehrlich, comme nous le verrons tout à l'heure.

2° ACTION DU SULFATE DE MAGNÉSIE SUR CERTAINES URINES

Au cours de nos recherches nous avons donc rencontré des urines pathologiques qui donnent un azoïque rouge semblable à celui qu'Ehrlich obtenait, mais sur lequel le sulfate de magnésie réagit d'une façon toute spéciale.

L'urine se colore ou ne se colore pas par le perchlorure de fer, et donne avec le réactif d'Ehrlich une coloration rouge. Si l'on sature l'urine de sulfate de magnésie, l'intensité de la coloration rouge augmente énormément alors que d'autres réactions rouges ne sont nullement influencées par cette addition de sel neutre : telles sont les urines des rougeoleux, des tuberculeux et des typhiques.

Au cours de nos recherches nous en avons rencontré 19 cas, toujours au cours de maladies peu définies, dans des urines de diabétiques ou de malades atteints d'affections rénales. La réaction était souvent coexistante avec l'acétone ou les dérivés acétoniques et nous nous sommes demandés si, comme l'avait cru Jackst (30) la cause serait due à l'acétone ou l'acide acétylacétique.

Nous avons extrait successivement l'acétone par simple distillation en présence d'acide phosphorique et de

ponce, puis sans addition d'acide phosphorique : l'acide diacétique par extraction étherée après acétification, et l'acide oxybutyrique selon la technique ordinaire (57).

Ni les uns ni les autres ne donnaient la réaction.

De plus, certaines urines qui ne donnaient pas les réactions de Bonnamour et Imbert (1) de Penzold et de Denigès (10) donnaient cette coloration rouge ; tandis qu'après distillation lente les réactions acétoniques devenaient positives et qu'on retrouvait dans le distillat de petites quantités d'acétone oscillant entre 0.30 à 0.40 litre. A ce moment la diazoréaction devenait négative et dans le résidu et dans le distillat.

Nous avons alors supposé que le corps qui copule dans ces conditions est vraisemblablement un corps susceptible de former l'acétone sans qu'il nous soit possible de le prouver.

Répétant la même distillation dans le vide en refroidissant le réfrigérant à 0° nous sommes arrivé au même résultat.

Sur ces 19 malades dont nous avons examiné les urines, un seul a présenté la réaction pendant deux jours seulement et a guéri. Toutes les autres urines ont été positives jusqu'à issue fatale qui suivait de 8 à 15 jours l'apparition de cette réaction colorée.

Etant donné le grand nombre de diazoréactions positives que nous avons rencontrées, sur lesquelles le sulfate de magnésie n'avait aucune action, la façon différente dont se comporte vis-à-vis des réactifs la substance qui provoque la coloration et les maladies différentes qui semblent la causer on est tenté d'admettre que la colo-

ration rouge provoquée par la diazotation peut être donnée par 2 corps différents, si l'on élimine les réactions dues aux médicaments. L'un semble être l'acide aminé qui, par hydratation, forme les dérivés acétoniques comme le supposent Von Jackst, Von Noortheen, alors que l'autre serait uniquement la cause de la diazo-réaction d'Ehrlich.

V. — CARACTÈRES DE LA DIAZORÉACTION POSITIVE

Nous avons alors admis qu'une diazoréaction positive était donnée par trois caractères : la coloration du liquide, la coloration de la mousse, et la formation d'un précipité verdâtre au fond du tube après 24 h. De plus, l'addition d'ammoniaque à l'urine ne doit y provoquer aucune coloration rouge ou jaune après 1/2 heure de contact.

A. — COULEUR DU LIQUIDE

Nous avons admis quatre intensités de colorations comme l'avait publié Ehrlich.

R₁ rouge orangé.

R₂ rouge vermillon.

R₃ rouge écarlate.

R₄ rouge bordeaux.

Ces quatre colorations ne doivent pas être accentuées par le sulfate de magnésie, ni diminuées après saturation par le sulfate d'ammoniaque et une minute d'ébullition. De plus le perchlorure de fer ne doit donner à l'urine aucune coloration rouge.

B. *Mousse*. — Elle doit être colorée en rouge, ou jaune orangé foncé et persistante. Quand le liquide est coloré en jaune orangé et que la mousse est rose, on ne doit pas penser à une réaction positive, car l'ingestion de morphine ou la saturation de l'urine par Na Cl, peuvent également accentuer la coloration de la mousse.

La mousse obtenue dans ce cas est toujours due à des matières albuminoïdes appartenant tantôt au groupe des albumoses, plus rarement à des syntonines.

C. *Précipité*. — Dans toutes les réactions positives on constate après 24 heures de repos la formation d'un précipité caractéristique au fond du tube. Il est formé d'une couche supérieure vert olivâtre et d'une couche inférieure jaune brun. Il a la même origine albuminoïde que la mousse, et on peut, en agitant très légèrement le tube à essais, constater qu'une partie de ce précipité provient de la mousse et tombe alors dans le fond du tube à essais.

D. *Caractères d'une urine positive*. — Toutes les urines positives que nous avons rencontrées présentaient des caractères généraux fixes.

1° Elles sont toujours fortement acides au tournesol, ne bleuissent pas le papier rouge Congo et elles conservent facilement cette acidité plusieurs jours.

2° Leur densité est toujours très élevée et varie entre 1030 et 1045.

Ce fait s'explique aisément étant donné la petite quantité d'urine que les malades éliminent en 24 heures. Il est rare de voir le taux urinaire dépasser 900 à 950 cm³ par 24 heures.

3° Elle sont toutes fortement colorées sans cependant tacher le papier filtre ; mais il existe des urines fortement colorées, par exemple les urines d'ictériques, qui ne donnent pas la réaction. Sous l'action des alcalis la coloration s'accroît et passe après quelques heures au jaune. (Justin Mueller (44).

4° Après défécation par le sous acétate de plomb en milieu acide, le précipité séparé prend une teinte cha-mois, tandis que le filtrat s'écoule franchement jaune (Justin Mueller (44).

5° Toutes les urines ont une teneur exagérée en dérivés indoxyliques, mais des urines fortement chargées en ces dérivés peuvent ne pas donner la réaction.

RÉACTIONS POSITIVES



R. 4



R. 3



R. 2



R. 1

RÉACTIONS NÉGATIVES



VI. — ACTION DES ÉLÉMENTS
ET DES DIFFÉRENTS CORPS CHIMIQUES
SUR LES URINES
DONNANT LA DIAZORÉACTION

Action de l'air. — L'air libre a une action oxydante sur l'urine et contribue à faire disparaître une partie du corps qui donne la diazoréaction. L'évaporation de l'urine à l'air libre est donc pratiquement impossible, mais si l'on opère à l'étuve à $+34^{\circ}$ le liquide se recouvre rapidement d'une pellicule et l'opération devient réalisable. La distillation dans le vide à $+34^{\circ}$ est moins facile car l'arrivée incessante de l'air au milieu du liquide, bien qu'augmentant au début l'intensité de la réaction, finit par la faire décroître brusquement jusqu'à disparition complète. Le résidu ne donne plus alors aucune coloration par les réactifs ; la réaction faite sur le distillat est également négative. Cependant si au cours de cette distillation dans le vide on remplace le courant d'air par un courant de gaz d'éclairage, on obtient un extrait dans lequel le principe qui réagit subsiste à peu près intégralement.

Action de la chaleur. — Le corps est thermolabile, non volatilisable, sa destruction est proportionnelle à

la quantité de chaleur fournie et au temps employé.

Un litre d'urine porté à l'ébullition et maintenu 10 minutes à cette température perd très peu de son pouvoir « diazoréactionnant » alors que la même quantité d'urine chauffée à $+45^{\circ}$ pendant 2 heures perd presque totalement la faculté de produire la réaction. La disparition est totale à la cinquième heure. Au-dessous de $+37^{\circ}$ la réaction n'est plus entravée par la chaleur comme on est en droit de s'y attendre.

La lumière combinée à l'action de l'air, sans entraver la réaction, agit cependant sur le chromophore en provoquant dans l'urine, comme dans les extraits urinaires, une coloration plus foncée, tandis que l'intensité de la réaction diminue.

Oxydation. Dans ces urines qui sont naturellement acides, comme dans celles qui ont été neutralisées, l'oxydation agit différemment selon l'intensité avec laquelle on la provoque.

Si l'oxydation est faible et longue, il se produit alors une augmentation très nette de l'intensité de la réaction, puis un abaissement progressif et enfin une disparition totale.

L'hydrogénation a une action inhibitrice marquée et la diazoréaction devient de moins en moins positive. L'atténuation de la réaction reste proportionnelle à la durée et à l'intensité de l'hydrogénation.

Les acides forts entravent la réaction.

Ce sont principalement les acides sulfurique, chlorhydrique, azotique et phosphorique.

Le chlorure de baryum, le sulfate de magnésie, le

sulfate d'ammoniaque, le chlorure de sodium n'ont aucune action sur la diazotation ou sur le corps diazorréactionnant.

Le charbon animal après une macération de 48 h. au 1/20 retient une grosse partie du corps qui réagit. (Loeper (36)). Il ne la libère pas par épuisement aqueux, mais en partie à l'alcool ammoniacal (3 o/o) tandis qu'une autre partie reste fixée sans qu'il soit possible de la libérer.

Le tanin. Comme après absorption, le tanin agit *in vitro* sur l'urine en empêchant formellement la réaction.

Les hypobromites, hypochlorites, hypoiodites, entravent la formation de l'azoïque coloré.]

Le talc. Après macération de 48 heures dans les proportions de 20 o/o, le talc ne retient rien du principe diazorréactionnant.

VII. — TENTATIVES D'EXTRACTION

Ayant ainsi bien défini les causes qui peuvent influencer la réaction comme sur le corps lui-même, nous avons tenté d'extraire et d'identifier ce corps par solubilisation et par précipitation.

Pour y arriver nous avons cherché à ne jamais perdre de vue au cours de cette extraction la coloration rouge que l'on obtient par diazotation, en opérant tantôt sur l'urine elle-même, tantôt sur des extraits urinaires pour avoir un rendement plus important en partant de moins de réactifs.

Concentration. L'urine qui donne la réaction d'Ehrlich a toujours été filtrée, puis évaporée simplement sur des assiettes à l'étuve à plus + 34° à l'abri de la lumière. Les extraits ont été réunis, redissous dans un peu d'eau distillée pour obtenir une concentration au dixième qu'on a filtrée à nouveau. De cette façon le rendement était d'environ 85 o/o de l'intensité primitive.

A. — EXTRACTION A L'AIDE DE SOLVANTS NON MISCIBLES A L'URINE

Nous avons successivement tenté l'extraction du corps « diazoréactionnant » de l'urine à l'aide de différents sol-

vants en opérant systématiquement sur les urines et sur les extraits en milieux acide, basique ou neutre. Nous avons essayé ainsi : le chloroforme, le xylol, la benzine, le sulfure de carbone et le tétrachlorure de carbone. Après 48 heures et agitation fréquente, ces solvants n'avaient absolument rien enlevé à l'urine ou aux extraits.

D'autres, comme l'alcool amylique, l'acétate d'amyle et l'éther s'emparent d'une partie de la substance active mais très difficilement.

L'éthér. L'urine a été agitée avec 20 o/o d'éther sulfurique Codex 1908. Après 48 heures l'éther a été décanté et évaporé. Le résidu donnait la diazoréaction. En répétant l'opération avec de l'urine acidifiée à 20 o/o par l'acide acétique ou alcalinisée par 2 o/o d'ammoniaque on obtenait après évaporation un résidu plus abondant qui donnait une réaction plus intensive. Cependant, si par addition d'éther de pétrole on chasse de ce liquide éthéré l'eau qui y est contenue, l'éther ne donne plus alors après évaporation qu'un faible résidu et aucune diazoréaction.

100 cm³ extraits ont été évaporés à sec, triturés avec du sable, épuisés 8 jours au soxlet après addition de 200 cm³ d'éther.

L'opération terminée, la couche éthérée décantée donnait par diazotation une coloration jaune non spécifique : le résidu de l'évaporation donnait une réaction plus nette, plus colorée.

100 cm³ d'extrait furent encore évaporés à sec à l'étuve, puis dans le vide sulfurique, et le résidu trituré avec un excès de magnésie calcinée pour obtenir une poudre

impalpable et entièrement déshydratée. Le tout a été introduit dans un Soxlet avec 200 cm³ d'éther et distillé 8 jours. L'éther n'avait rien solubilisé du principe actif.

Expériences qui prouvent nettement qu'il est impossible comme le prétendent Hermann et Sachs de solubiliser par l'éther la substance « diazoréactionnante ». L'éther n'enlève cette substance que proportionnellement à la faculté qu'il a de s'emparer de l'urine, donc des corps qui y sont solubles. Ce qui semble expliquer également que Sachs et Hermann (27) aient dû partir de liquides très concentrés pour obtenir plus de principe en solution dans la même quantité d'urine qu'absorbait l'éther (41).

L'alcool amylique ne s'empare du corps qui réagit que quand lui-même est très acide, et il cède de nouveau le chromogène à l'eau sodée.

Pour obtenir un épuisement à peu près absolu de l'urine par ce solvant, il est nécessaire de renouveler souvent l'alcool amylique et d'acidifier de nouveau. L'épuisement est proportionnel à la quantité d'urine que le solvant peut solubiliser.

La technique qui nous a donné le meilleur rendement est la suivante :

Urine	1000
HCl	300
Alcool amylique	100

On laisse en contact 56 heures à + 34° à l'étuve avec agitation fréquente. L'alcool amylique est décanté,

neutralisé par NaOH et alcalinisé par un léger excès de lessive de soude. La solution aqueuse alcaline qui contient intégralement le corps « diazoréactionnant » qui était dissous dans l'alcool amylique est évaporée à cristallisation et les cristaux sont éliminés. L'extrait est repris par l'eau, neutralisé exactement par HCl, évaporé à nouveau, puis les cristallisations éliminées par centrifugation. Dans ces conditions on s'empare de la substance active contenue dans environ 30 cm³ d'urine.

Un deuxième épuisement après addition de 50 cm³ d'HCl pur permet de solubiliser encore un peu du principe dans l'alcool amylique neuf, mais comme dans le premier épuisement les résidus que l'on obtient après neutralisation, évaporation, purification relative bien entendu, demeurent toujours constitués par des éléments normaux et anormaux de l'urine, en bien plus fortes quantités que le principe que nous recherchions.

L'*acétate d'amyle* agit absolument comme l'alcool amylique : le principe qu'il solubilise passe intégralement dans l'eau sodée.

Il permet cependant de solubiliser une plus forte quantité du principe « diazoréactionnant » de l'urine. En opérant comme nous l'avions fait précédemment 1 litre d'urine a cédé la substance active contenue dans environ 35 cm³ d'urine.

B. — A L'AIDE DES LIQUIDES MISCIBLES A L'URINE

Les solvants comme l'alcool à 96°, l'acétone, la pyridine agissent sur les extraits urinaires desséchés d'abord

à $+ 30^{\circ}$ puis dans le vide, en solubilisant une faible partie du principe et une grosse partie des principaux constituants de l'urine.

En essayant leur action dissolvante sur l'urine saturée de sulfate d'ammoniaque et filtrée, il se forme une couche supérieure qui contient une partie du principe « diazoréagissant » alors que la couche aqueuse inférieure en contient encore.

Si on veut épuiser cette solution aqueuse à l'aide de ces solvants, on s'aperçoit que le terme absolu d'épuisement est quand tout le liquide aqueux a été dissous par le solvant. Ce qui prouve qu'ils solubilisent eux aussi non pas des corps mais seulement l'urine.

En dehors donc de ces trois derniers solvants miscibles à l'eau nous avons conclu que :

1° L'urine en milieu naturellement acide, neutre ou alcalin ne cède que des quantités infimes du principe actif aux solvants.

2° L'urine acidifiée par l'acide acétique cède des quantités très faibles de substance à l'éther, l'alcool amylique, et à l'acétate d'amyle. Cette solubilité augmente si l'on acidifie très fortement par HCl, mais elle n'augmente pas par saturation de l'urine à l'aide d'un sel neutre.

C. — ACTION DES PRÉCIPITANTS

Le réactif de Patein n'a qu'une action inconstante et irrégulière sur le principe qui donne la diazoréaction. Nous avons toujours opéré de la manière suivante :

Nous avons ajouté à de l'urine du réactif de Patein

jusqu'à ce que l'addition d'une ou deux gouttes ne forme plus de précipité, puis de la soude à 36° goutte à goutte en agitant jusqu'à réaction légèrement alcaline, porté ensuite le volume au double du volume d'urine initial et filtré. A ce moment le liquide était très légèrement alcalin et ne précipitait plus par la soude. Avons ajouté alors de la poudre de zinc laissé 24 heures en contact puis filtré de nouveau.

Dans ces conditions le filtrat donnait parfois une diazoréaction aussi intense que l'urine directe diluée à 50 o/o. Les autres fois la substance active restait englobée en majeure partie sur le filtre et était libérable par agitation à l'eau ammoniacale.

De plus en traitant de la même façon certaines urines « normales » le filtrat donnait également une coloration rouge non spécifique.

Le réactif de Courtonne ajouté à l'urine préalablement neutralisée, est incapable de précipiter le corps actif d'une façon constante. Certaines urines sont déféquées de la substance, d'autres partiellement, d'autres pas du tout.

Le sous-acétate de plomb agit en milieu légèrement acétique de façon toujours uniforme. Le principe qui donne la diazoréaction passe toujours intégralement dans le filtrat.

Le réactif de Courtonne ammoniacal défèque uniformément les urines de la substance qui réagit et il ne passe absolument rien dans le filtrat si l'on a soin d'ajouter à l'urine un excès de réactif.

La solution aqueuse saturée à froid d'*acétate cuivri-*

que insolubilise une grosse partie du corps qui donne la réaction. Le filtrat conserve cependant le pouvoir de donner la diazoréaction. La quantité de substance « diazoréactionnante » qui précipite dans ces conditions varie avec les urines : elle est en général des 4/10 de l'intensité totale.

IX. — TECHNIQUE D'ISOLEMENT

Après avoir recherché quelles sont les principales causes ou les principaux corps qui peuvent modifier ou transformer la substance qui donne la diazoréaction soit en agissant sur sa structure chimique, soit en agissant sur la diazotation, nous avons tenté en combinant l'action des précipitants ou des solvants, d'extraire le corps actif de l'urine et d'identifier le corps obtenu. Dans le cours de ces recherches, nous n'avons jamais perdu de vue la formation de l'azoïque rouge puisque c'était là le seul témoignage possible de la présence du corps.

TECHNIQUE EMPLOYÉE

L'urine est traitée de la façon suivante :

Urine (R ₂).	1.000
Réactif de Courtonne.	250
Acide acétique pur (codex).	20

On laisse le précipité se déposer, on le lave ensuite à l'eau acétique et on filtre. Le chromogène passe

intégralement dans ce filtrat. Celui-ci est alors additionné d'ammoniaque jusqu'à cessation de précipité, puis on ajoute X gouttes en excès. On laisse déposer 24 heures, en s'assurant que la liqueur est franchement alcaline au tournesol.

On filtre de nouveau pour recueillir le précipité ammoniaco-plombique qui contient intégralement tout le chromogène. Ce précipité est lavé à plusieurs reprises dans l'eau ammoniacale à 10/0 puis essoré au Buchner.

On le recueille alors soigneusement et on le met en suspension dans 30 cm³ d'eau. On acidule avec une solution aqueuse saturée d'acide tartrique, on chauffe à + 30°, on laisse en contact une vingtaine de minutes et on filtre de nouveau. On renouvelle ainsi cette opération deux ou trois fois jusqu'à ce que le filtrat s'écoule entièrement incolore. Les eaux tartriques sont réunies, agitées avec un peu de carbonate de chaux qui élimine le plomb et l'acide tartrique. Après 48 heures de contact on filtre, on lave le résidu à l'eau et on complète à 100 cm³.

De cette façon nous avons éliminé de l'urine les albumines par précipitation plombique en milieu acide, puis séparé du filtrat le chromogène en l'englobant par précipitation ammoniaco-plombique. De ce précipité nous avons libéré le corps par acidification, ce qui nous a permis de l'obtenir plus concentré mais avec une intensité légèrement inférieure à l'intensité primitive.

Le filtrat est alors saturé de sulfate d'ammoniaque à chaud par une ébullition d'une minute, le tout est refroidi, puis filtré. Le résidu est lavé à l'eau saturée de sul-

fate d'ammoniaque, les eaux de filtration réunies. De ce filtrat qui contient la solution du principe « diazoré-actionnant » nous avons alors éliminé par cristallisations successives, le sulfate d'ammoniaque, toujours sans dépasser une température de $+ 30^{\circ}$. Quand la cristallisation est devenue difficile nous avons dissous le résidu dans l'acétone jusqu'à épuisement complet. Cependant la solution acétonique s'emparant de petites quantités de sulfate d'ammoniaque nous avons ajouté encore un peu d'eau de baryte jusqu'à précipitation exacte ce qui est facilement perceptible en opérant avec une pipette très effilée.

La solution ammoniacale a été alors évaporée et filtrée à plusieurs reprises, le résidu dissous dans l'eau et réévaporé jusqu'à ce qu'il soit entièrement incristallisable.

Les cristaux étant à ce moment très difficiles à éliminer du résidu sirupeux que nous avons obtenu, nous avons été obligé d'avoir recours à la filtration sur papier à l'aide de l'éther.

L'éther anesthésique anhydre et privé entièrement d'alcool, bien que ne solubilisant pas l'extrait obtenu, entraîne cependant mécaniquement et à froid au travers d'un papier filtre la substance active, sous formes de particules imperceptibles qui se réunissent au fond du vase à extraction en une couche sirupeuse brun foncé.

En répétant cette évaporation et cette filtration à plusieurs reprises nous avons alors obtenu, après avoir séparé l'éther, un liquide sirupeux pesant 5 gr. 72, d'une couleur brun rouge foncé, d'odeur désagréable et in-

cristallisable que nous ayons employé la chaleur, ou le vide sulfurique.

Nous avons alors redissous la totalité de ces 5 grs. 72 d'extrait dans quantité suffisante d'eau pour obtenir 15 cm³. Le liquide était alors fluide et plus facilement utilisable.

Pour savoir combien nous avions extrait de substances à l'urine primitive qui donnait une intensité de coloration égale à R₂, il nous suffisait donc de connaître simplement le poids de cette solution obtenue, soit 16 grs. 40, le nombre de gouttes qu'en contient un gramme : soit 17, et combien il suffit d'ajouter de gouttes à 5 cm³ d'urine ne donnant pas la réaction pour obtenir une intensité égale à 2 R₂ : soit 2 gouttes.

$$16.40 \times 17 = 278 \qquad \frac{278 \times 1000}{400} = 697$$

Nous nous sommes donc emparé de la substance contenue dans environ 697 cm³ d'urine alors que nous étions parti de 1000 cm³.

Sur cette solution ainsi obtenue nous avons recherché certains constituants de l'urine que divers auteurs avaient accusés de provoquer la diazoréaction.

L'extrait ne nous a nullement donné les réactions du buiret, de Millon, xanthoprotéique ou glyoxylique.

Il ne réduit nullement la liqueur de Fehling et ne la décolore même pas (produits aldéhydiques méthylcétoniques, créatinine) ne donne aucune déviation polarimétrique.

Mis en contact pendant 48 heures avec le 1/10 de son

poids de talc, ce dernier ne donne nullement les réactions de l'uroérythrine.

100 cm³ additionnés de 0,50 de soude aqueuse à 5 o/o ne se troublent pas et ne se précipitent pas (phosphates-hématoporphyrine).

La solution ne donne après extraction chloroformique aucune coloration ou fluorescence par l'acétate de zinc (urobiline).

Additionné de chlorure de baryum il ne se forme aucun louche et aucune précipitation (pigments).

La solution diluée à parties égales par de l'acide chlorhydrique et agitée avec du chloroforme ne colore pas ce dernier, même en présence de 2 gouttes d'eau oxygénée (indoxyle). Le chloroforme étant décanté et remplacé par de l'alcool amylique, l'alcool se colore en jaune plus ou moins foncé. Cette coloration n'est pas due aux dérivés scatoliques qui sont rouges mais à une simple solubilisation de la solution acide dans l'alcool amylique.

La solution fut évaporée à sec, chauffée lentement dans un ballon à long col muni d'un réfrigérant ascendant. La déshydratation étant complète il ne s'était déposé aucune cristallisation sur les parois froides du verre. (tyrosine-leucine).

RÉACTIONS DE LA SOLUTION

Le nitrate d'argent en milieu neutre précipite une partie du corps qui donne la réaction, tandis qu'une autre partie reste en solution.

Le perchlorure de fer donne un précipité jaune marron floconneux.

Le bichlorure de mercure n'a aucune action précipitante.

L'acide phospho-molybdique précipite intégralement le corps « diazoréactionnant ».

L'acide iodique est réduit après quelques heures avec mise en liberté d'iode qui colore la solution.

Toutes réactions qui sont celles de l'urochrome ainsi que l'a signalé Dombrowski en 1907.

Essayant alors l'action des solvants sur l'extrait desséché, nous avons constaté que l'acétone, la pyridine, le dissolvaient totalement, mais que l'alcool absolu laisse un résidu insoluble, résineux, jaune brun.

20 gr. de cet extrait ont été introduits dans un flacon bouché émeri et mis en contact avec 100 gr. d'alcool absolu pendant 48 heures avec agitation fréquente.

L'alcool a été décanté, recueilli et remplacé par 100 gr. d'alcool absolu neuf. Cette opération a été renouvelée 5 fois. La nouvelle extraction laissait l'alcool incolore alors qu'une substance résineuse, jaune marron était collée aux parois du flacon.

Ce résidu jaune marron a été dissous dans 20 cm³ d'eau distillée. Cette solution fortement colorée ne donnait par réfringence aucune coloration rouge.

La solution alcoolique était limpide, d'une couleur jaune brun mais rouge rubis par réfringence. Nous l'avons distillée dans le vide sans dépasser une température de + 30°.

Le résidu de cette évaporation a été dissous dans un

peu d'eau distillée, filtré, rééaporé puis redissous dans 200 cm³ d'alcool absolu que nous avons redistillé comme précédemment. Le résidu a été récupéré, évaporé à l'étuve puis dans le vide sulfurique, enfin redissous dans 20 cm³ d'eau distillée.

Nous avons donc à ce moment deux extraits en solution aqueuse, l'un provenant de la solution alcoolique évaporée que nous appellerons « extrait alcoolique », l'autre résidu de l'épuisement par l'alcool absolu mais soluble dans l'eau que nous appellerons « extrait aqueux ».

IX. — IDENTIFICATION

Ces deux solutions donnaient par diazotation une coloration à peu près égale et se comportaient d'une façon identique vis-à-vis des réactifs. Nous nous sommes demandé alors, si comme l'avait vu Dombrowski en 1908 (14) leurs différences de solubilité dans l'alcool, puisque ces deux corps donnaient toutes les réactions connues de l'urochrome, ne seraient pas simplement dues à ce fait que d'un côté l'urochrome était libre, alors que de l'autre il serait combiné à l'état de sel alcalino-terreux insoluble dans l'alcool.

Pour s'en rendre compte il suffisait donc de précipiter l'une et l'autre de ces solutions par un excès de solution aqueuse d'acétate de cuivre puisque l'élimination des acides sulfurique, phosphorique et urique était totale.

Dans un cas l'urochrome libre soluble dans l'alcool ne devait pas précipiter, dans l'autre la précipitation à l'état de sel cuivreux devait être intégrale puisque seuls les sels alcalino-terreux de l'urochrome sont précipités dans ces conditions par l'acétate de cuivre à froid.

Suivant la technique indiquée par Dombrowski (13) nous avons traité successivement l'une et l'autre de ces solutions par un excès de solution aqueuse saturée d'acétate de cuivre à froid.

**A. — LA SOLUTION DE L'EXTRAIT AQUEUX
EST INTÉGRALEMENT PRÉCIPITABLE PAR LES SELS
DE CUIVRE ET N'EST DONC CONSTITUÉE QUE PAR
LES SELS DE L'UROCHROME**

Nous sommes partis de 5 gr. d'extrait aqueux dissous dans 10 cm³ d'eau distillée neutre. Nous avons ajouté 95 cm³ de solution saturée d'acétate de cuivre en neutralisant au fur et à mesure par addition d'ammoniaque. Nous avons laissé déposer le précipité 48 heures à la glacière, décanté, lavé, enfin recueilli sur un filtre de porcelaine.

Ce précipité d'un jaune vert sale a été dilué dans environ 20 cm³ d'eau distillée et décomposé par l'hydrogène sulfuré à une température de + 34°. La liqueur a été filtrée, le résidu de sulfure de cuivre lavé à l'eau distillée.

Le filtrat limpide coloré en jaune brun ne donnait pas la diazoréaction. Mais après avoir été chauffé à + 34°, sous 2 cm³ de mercure dans un courant d'acide carbonique pendant 12 heures, nous avons obtenu un résidu qui, dissous dans 10 cm³ d'eau donnait une diazoréaction fortement positive. Une grande partie de la substance était cependant disparue.

La solution cuivrique qui nous avait donné ce précipité

cuivreux d'urochrome a été décomposée dans les mêmes conditions par l'hydrogène sulfuré et filtrée.

L'acide sulfhydrique a été chassé dans le vide et le résidu repris dans 10 cm³ d'eau. La solution ne nous donnait aucune diazoréaction.

**B. — LA SOLUTION AQUEUSE DE L'EXTRAIT
ALCOOLIQUE N'EST PAS ENTIÈREMENT
PRÉCIPITABLE PAR L'ACÉTATE DE CUIVRE**

En opérant absolument dans les mêmes conditions sur l'extrait alcoolique, nous n'avons précipité que très peu de substance par l'acétate de cuivre, mais le filtrat contenait environ 80 o/o de l'intensité totale.

Nous avons éliminé le cuivre de ce filtrat par l'hydrogène sulfuré comme précédemment, puis nous avons concentré le liquide à 10 cm³.

Nous avons alors ajouté 20 cm³ d'eau de chaux, évaporé le tout à l'étuve à + 34° pour obtenir le sel de calcium de l'urochrome avec un léger excès de chaux. Le résidu était alors formé par une masse résineuse brun rouge. Nous l'avons redissous dans 10 cm. d'eau distillée et précipité par l'alcool.

Ce sel de calcium purifié et récupéré a été redissous dans 10 cm³ d'eau distillée et traité comme précédemment par l'acétate de cuivre. Nous avons cette fois obtenu un précipité jaune vert sale qui contenait toute la substance « diazoréactionnante » de l'extrait, mais après

décomposition le filtrat cuivrique ne contenait aucune trace du corps qui donne la diazoréaction.

Au cours de ces opérations nous avons remarqué que le courant d'hydrogène sulfuré doit être ménagé ; la température nécessaire pour chasser l'acide sulfhydrique peu élevée, car le principe « diazoréactionnant » est alors beaucoup plus facilement réduit. L'action de l'hydrogène sulfuré semblant entraver la fonction chimique de l'urochrome qui donne la diazoréaction sans cependant faire disparaître l'action réductrice de l'urochrome sur l'acide iodique.

C. — LA DIAZORÉACTION EST DONNÉE ENCORE PAR UN CORPS AUTRE QUE L'UROCHROME OU SES SELS ALCALINS TERREUX

Il semblait alors évident qu'en opérant inversement c'est-à-dire en faisant le sel de calcium de l'urochrome avant de traiter par l'acétate de cuivre on doive précipiter intégralement toute la substance « diazoréactionnante » de l'urine à l'état de sel cuivreux.

Partant de 10 grammes d'extrait alcoolique, nous avons ajouté 50 cm³ d'eau de chaux, évaporé repris par 20 cm³ d'eau distillée et, l'excès de chaux ne gênant pas la réaction nous avons ajouté en neutralisant constamment 200 cm³ de solution d'acétate de cuivre laissé déposer recueilli le précipité et le filtrat.

Le précipité après lavage a été décomposé par H²S.

Il contenait environ 30/100 de l'intensité totale de l'extrait alcoolique tandis que le filtrat après décomposition par H^2S , élimination de l'acide sulfhydrique et filtration donnait nettement une diazoréaction d'une intensité qui correspondait grossièrement aux 70 0/0 restant.

L'action de l'hydrogène sulfuré seul pouvait donc avoir eu une influence et il importait alors de savoir si la réduction à elle seule permet de transformer le corps qui réagit au point qu'il précipite ensuite à l'état de sel de calcium par l'acétate de cuivre. Pour arriver à ce but, il suffisait donc simplement de réajouter à cette solution d'où H^2S était éliminé, un nouvel excès d'acétate de cuivre pour voir si cette fois la précipitation serait intégrale. Répétant donc l'opération nous avons obtenu de nouveau un précipité cuivreux qui contenant la totalité du corps donne la diazoréaction.

Pour vérifier la véracité de ces faits et nous assurer que l'une ou l'autre de ces substances ne s'était pas formée au cours de l'extraction nous avons répété la technique de Dombrowski (13) sur des urines positives fraîches après défécation d'un litre par le mélange.

Acétate de calcium	9
Acétate de baryum.	4
Solution d'ammoniaque à 21 0/0	3 cm 5

Nous avons alors constaté que le principe actif n'est pas entièrement précipité de l'urine par le cuivre mais qu'il est précipité intégralement après réduction par l'hydrogène sulfuré.

Sur 44 urines diazoréactionnantes que nous avons

examinées, toutes ont précipité par l'acétate de cuivre une partie de la substance qui réagit. Dans le filtrat après élimination du cuivre et de l'hydrogène sulfuré à basse température, dans le vide, sous un courant de Co^2 , on retrouvait encore des quantités très variables du principe qui donne la réaction.

L'hydrogène sulfuré ayant vraisemblablement agi comme réducteur, la substance active qui restait dans le filtrat pouvait être intégralement précipitée par l'acétate cuivrique si on avait soin d'ajouter à cette solution un peu d'eau de baryte ou d'eau de chaux.

Etant donc bien établi que l'hydrogène sulfuré agit seul sur la substance non précipitable dans ces conditions par l'acétate de cuivre, il restait à savoir si après sa transformation elle pouvait être ramenée à son état primitif par oxydation, pour voir si la réduction seule agit sur le corps. Or pour Dombrowski la substance précipitable par l'acétate de cuivre (13) en milieu neutre dans ces conditions expérimentales bien déterminées n'est constituée que par la thio-urochrome.

Sur ce point les deux problèmes se lient, car pour se rendre compte si par un processus d'hydrogénation ou d'oxydation on peut passer de l'un à l'autre de ces corps il suffit en effet de tenter l'oxydation de l'urochrome et de voir si la précipitation par les sels de cuivre a toujours lieu dans les mêmes conditions expérimentales.

II. — L'OXYDATION TRANSFORME L'UROCHROME EN UN CORPS DONNANT LES MÊMES RÉACTIONS MAIS NON PRÉCIPITABLE PAR DE L'ACÉTATE DE CUIVRE

5 litres d'urine ont été déféqués par les acétates de calcium et de baryum en milieu légèrement ammoniacal. Après 24 heures le tout a été filtré et le filtrat précipité par un gros excès de solution saturée d'acétate de cuivre. Après 48 heures le précipité fut recueilli, lavé, mis en suspension dans un peu d'eau distillée traité par H^2S , filtré, puis l'acide sulfhydrique éliminé comme précédemment.

La solution urochromique réduite à 200 cm^3 a été additionnée de 200 cm^3 d'eau de chaux, évaporée à $+ 34^\circ$ en consistance sirupeuse, reprise par 5 cm^3 d'eau et enfin précipitée par l'alcool.

Le sel de calcium récupéré a été alors redissous dans l'eau et sur cette solution pure de sel urochromique nous avons essayé l'action oxydante de permanganate de potasse déjà signalée par Weiss (61). Nous avons employé pour réaliser ce but une solution de permanganate de potasse au 1/1000 que nous avons fait réagir sur la solution urochromique comme l'indique le tableau :

Nombre de cm ³ d'urine employés	Nombre de gouttes de MnO ⁴ K ajoutées	Intensité de la réaction après 12 heures	Action de l'acétate de cuivre
5	I	R'	précipitation
5	II	R'	id.
5	III	R ²	id.
5	IV	R ²	précipitation partielle
5	V	R ³	aucune précipitation
5	VI	R ³	id.
5	VII	négative	id.
5	VIII	négative	id.

Ces expériences confirment nos recherches précédentes.

Nous sommes donc parti d'un corps nettement déterminé par Dombrowski pour obtenir un autre corps dont toutes les réactions sont identiques à la thio-urochrome, sauf la précipitation par l'acétate de cuivre.

E. — LA RÉDUCTION DE CE CORPS « DIAZORÉACTION- NANT » NON PRÉCIPITABLE PAR L'ACÉTATE DE CUIVRE, DONNE DE L'UROCHROME

Reprenant alors la question du côté inverse, nous avons déféqué une urine « diazoréactionnante » par les acétates alcalino-terreux, puis éliminé la thio-urochrome de Dombrowski par l'acétate de cuivre. Le filtrat a été traité

par l'hydrogène sulfuré, l'acide sulfhydrique éliminé, nous avons ajouté un peu d'eau de chaux enfin précipité à nouveau par la solution cuivrique. Nous avons obtenu un précipité analogue à celui que donne l'urochrome dans ces conditions. Nous l'avons décomposé par l'hydrogène sulfuré comme précédemment, puis transformé de nouveau en sel de cuivre que nous avons distillé dans le vide pour y identifier le noyau pyrrolique et y effectuer les principales réactions de l'urochrome.

Cinq grammes de ce composé cuivrique ont été broyés avec de la chaux, puis introduits dans un tube de verre fermé à une extrémité. Au-dessus de ce mélange nous avons ajouté un tampon d'amiante, puis soudé le tube à un autre tube de diamètre inférieur coudé en U. Dans la branche de l'U nous avons soufflé auparavant trois boules pour recueillir les produits de la distillation. Nous avons fait le vide dans l'appareil, placé le tube réfrigérant dans un mélange de glace et de sel, et chauffé la partie du tube qui contenait le sel cuivrique. Il distilla d'abord quelques gouttelettes d'eau puis quelques gouttelettes huileuses. Quand la distillation fut entièrement terminée, le tube refroidi a été sectionné et le produit de distillation épuisé par l'éther dans lequel les gouttes huileuses qui s'étaient déposées sont entrées en solution. Cette solution éthérée fut divisée en trois parties.

1° La première partie par évaporation donnait des vapeurs qui rougissaient nettement le copeau de sapin imbibé d'acide chlorhydrique.

2° L'extrait éthéré fut agité avec le chlorhydrate de

diazobenzène. L'éther solubilisa alors nettement un azoïque jaune, alors que l'hémopyrol donne un azoïque rouge dans ces conditions.

L'acide sulfurique agissant sur la solution dissout le colorant et donne une coloration bleue.

3° La troisième partie de cette solution étherée fut évaporée à $+ 34^{\circ}$, reprise par l'eau et traitée par l'acide chlorhydrique qui se colora en rouge pourpre, puis en violet. Il n'y avait aucune fluorescence par les sels de zinc.

Toutes réactions de Dombrowski avaient été trouvées dans l'identification des composés cuivriques de l'urochrome (13).

D'après ces expériences il semble donc que la diazoréaction dans les urines est donnée par trois corps, ayant le même noyau pyrrollique :

1° L'urochrome ou thio-urochrome de Dombrowski.

2° Les sels alcalino-terreux de la thio-urochrome.

3° Un corps plus oxydé de même structure qui se transforme en urochrome par réduction, tandis que l'urochrome oxydé peut le former.

Au cours de ces opérations nous avons toujours eu une grosse perte du produit diazoréactionnant due à l'action trop réductrice de l'hydrogène sulfuré, mais nous avons pu cependant constater que l'urochrome et ses sels alcalino-terreux tout en prenant une part active dans la diazoréaction n'ont cependant qu'un pouvoir « diazoréactionnant » inférieur au corps non précipitable par l'acétate de cuivre avant réduction. Si à une solution d'urochrome d'intensité R^2 on ajoute 5 gouttes d'une

solution de permanganate au millième après 6 heures, l'intensité de la coloration atteint R⁴ comme l'indiquent les résultats exprimés dans notre tableau, tandis que le corps ne précipite plus par l'acétate de cuivre. Ce fait semble confirmer les travaux de Dombrowski qui montrent nettement qu'à la longue les solutions d'urochrome, où les urines laissées à l'air, précipitent bien plus difficilement par l'acétate de cuivre.

Il viendrait également à l'appui des travaux de Weiss qui prétend que la diazoréaction est due à l'urochromogène que contiendraient seulement les urines pathologiques et non les urines des sujets sains.

C'est alors qu'il nous a semblé intéressant d'entreprendre et sur les urines du malades donnant la diazoréaction et sur les urines de sujets sains la recherche de l'urochrome et de ce corps dit « oxy-urochrome », en appliquant la méthode de Dombrowski qui se base sur l'action réductrice de l'urochrome envers l'acide iodique.

X. — DOSAGE DE L'UROCHROME ET DU CORPS DIT « OXY-UROCHROME »

Comme les expériences nous l'ont montré plus haut, lors de la défécation des urines par les acétates de calcium et de baryum en milieu alcalin, on transforme l'urochrome libre à l'état de sels alcalino-terreux entièrement solubles dans l'eau, insolubles dans l'alcool et précipitables intégralement par l'acétate de cuivre. Dans ces mêmes conditions le corps qui donne la diazoréaction ne précipite pas totalement par les sels cuivriques, mais après réduction par l'hydrogène sulfuré cette partie « diazoréactionnante » se conduit envers les réactifs comme l'urochrome lui-même. On peut donc en suivant la méthode de Dombrowski, doser dans l'urine, d'une part l'urochrome et ses sels alcalino-terreux, et d'autre part dans le filtrat, après réduction, le corps que nous appelons « oxy-urochrome ».

• Nous avons essayé de réaliser ces expériences sur les urines de sujets sains et sur des urines positives en

suivant exactement la technique que Dombrowski signala en 1907.

Urine	150
Acétate de calcium	1,80
Acétate de baryum	0,80
Ammoniaque à 21 0/0	0,65

Laissé déposer plusieurs heures, filtré, neutralisé par l'acide acétique et filtré à nouveau.

Nous avons alors prélevé 100 cm³ du filtrat, précipité par un excès de solution saturée d'acétate de cuivre en neutralisant au fur et à mesure par l'ammoniaque. Le mélange a été laissé pendant 48 heures à la glacière, puis filtré et le précipité recueilli sur un filtre Buchner. Le filtrat a été mis à part pour y doser l'oxy-urochrome, tandis que le précipité était lavé soigneusement, mis en suspension dans un peu d'eau distillée, décomposé par l'hydrogène sulfuré à une température de + 50° et filtré. Ce filtrat a été ensuite chauffé dans le vide dans un courant d'acide carbonique où il s'est concentré, tandis que l'acide sulfhydrique était décomposé. Le résidu a été redissous dans un peu d'eau, filtré et le filtre lavé à l'eau distillée.

La solution urochromique fraîche ainsi obtenue a été introduite dans une ampoule à décantation avec 10 cm³ de sulfure de carbone, puis nous avons ajouté de l'acide iodique à 5 0/0 jusqu'à virage au bleu du papier rouge Congo.

L'iode mise en liberté s'est dissoute dans le sulfure de carbone. Après 4 heures de contact nous avons décanté

la solution inférieure, l'avons remplacée par du sulfure de carbone neuf, enfin renouvelé cette opération 5 fois en réunissant le sulfure de carbone d'épuisement.

Cette solution qui contenait l'iode libérée fut lavée à l'eau jusqu'à ce que les eaux de lavage ne rougissent plus le papier de tournesol rouge, puis titrée à l'aide d'une solution centinormale d'hyposulfite de soude.

Le terme de la réaction étant appréciée par la décoloration totale de la liqueur.

Or sachant d'après Dombrowski qu'à 1 gramme d'urochrome pur correspond à 0 gr. 13192 d'iode, que d'autre part 1 cm³ de solution d'hyposulfite N/100 correspond à 0,00127 d'iode le calcul était facile.

$$\frac{1 \times 0,00127}{0,13192} = 0,009627$$

Un centimètre cube de la solution d'hyposulfite correspond donc à 0,009627 d'urochrome.

A. — URINE DES SUJETS SAINS

En opérant ainsi sur les urines de sujets sains nous avons trouvé des teneurs en urochrome variant entre 0 gr. 34 à 0 gr. 92. L'urochrome augmentait nettement dans le régime carné, diminuait chez les sujets soumis à des régimes végétariens ou lacto-végétariens.

Le filtrat cuivrique n'a jamais pu, après élimination du cuivre par l'hydrogène sulfuré, précipiter à nouveau

par l'acétate de cuivre ce qui semble prouver que les urines normales ne contiennent pas « d'oxy-urochrome.

Quantité d'urine émise en 24 heures	Quantité d'urochrome contenue dans un litre d'urine et évaluée en mm	Quantité d'urochrome évaluée en milligrammes		Régime
		par litre	émise en 24 heures	
1.700	442	44	754	normal
1.350	500	50	675	»
1.690	346	34	572	»
1.100	471	47	518	»
1.300	452	45	588	»
1.700	529	52	898	»
1.600	346	34	556	»
1.500	327	32	490	»
1.450	423	42	590	»
900	404	40	360	»
1.100	433	43	476	»
1.600	327	32	500	»
1.200	452	45	542	»
1.400	481	48	673	»
950	443	44	598	»
1.550	596	59	924	carné
1.250	577	57	721	»
1.200	500	50	600	»
850	558	55	470	»
1.200	288	28	346	lacté
1.500	241	24	360	»

**B. — URINES DONNANT UNE DIAZORÉACTION
POSITIVE.**

Dans la majeure partie de ces urines nous avons toujours trouvé de fortes quantités d'urochrome qui étaient toujours accompagnées du corps dit oxy-urochrome.

Pour rechercher et doser l'urochromogène, nous décomposions par l'hydrogène sulfuré à $+ 50^{\circ}$ le filtrat cuivrique. Le cuivre étant entièrement précipité à l'état de sulfure nous avons filtré, lavé le filtre à l'eau distillée et chassé l'hydrogène sulfuré comme précédemment dans le vide. Le résidu repris par un peu d'eau était filtré, le filtre lavé, et le filtrat précipité une seconde fois par un excès de solution aqueuse saturée d'acétate de cuivre. Le précipité recueilli, lavé, fut décomposé et traité selon la méthode de Dombrowski comme précédemment.

Volume des urines en 24 heures	Intensité de la diazoréaction	Dosage de l'urochrome		
		Nombre de centim. cubes d'S'O'Na ³ employés	Quantité d'urochrome pour mille évaluée en milligrammes	Quantité d'urochrome en 24 heures
800	R 4	8.4	808	569
900	R 2	9.8	943	943
850	R 2	5.1	490	409
980	R 2	6.2	596	584
900	R 2	8.2	789	710
600	R 4	12.4	1933	676
400	R 3	13.7	1348	539
350	R 4	11.4	1097	383
440	R 1	10.2	1058	699
500	R 1	8.4	808	404
350	R 2	5.2	500	175
740	R 4	12.5	1202	895
850	R 1	9.4	904	763
800	R 2	9.7	833	754
600	R 3	10	962	577
450	R 2	9.8	943	424
700	R 1	4.8	462	283
850	R 4	13.7	1348	1046
740	R 4	10	962	712
750	R 1	11.5	1071	830
440	R 4	11.4	1348	593
880	R 4	12	1548	916
320	R 3	8.2	789	252
900	R 3	13.9	1338	1204
820	R 2	10.4	1001	820
440	R 4	5.4	529	233
740	R 4	12.4	1933	883

Dosage du corps dit oxy-urochrome après sa transformation en urochrome			Total de l'urochrome et oxy-urochrome
Nombre de centimètres cubes d'S'O ³ Na ⁺ employés	Quantité d'oxy-urochrome contenue dans un litre d'urine, évaluée en milligrammes	Quantité d'oxy-urochrome évaluée en urochrome en 24 heures	
4.3	413	331	1225
2.4	231	216	1174
4.9	471	400	962
3.6	346	340	943
5.1	577	519	1367
4.2	404	242	1797
3.9	375	150	1724
5.3	510	178	1607
3.2	307	135	1366
2.1	202	101	1010
4.4	423	148	924
4.6	442	318	1645
3.3	317	269	1222
4.6	442	354	1276
4.5	433	259	1395
3.7	346	157	1289
3.9	375	261	837
5.4	529	450	1877
5.8	558	413	1521
2.4	241	180	1340
4.5	433	190	178
5.2	500	440	165
4.7	452	144	1241
3	288	259	1620
3.4	327	298	1328
5.3	510	224	1040
4.6	443	338	2370

D'après ces deux séries de dosage, il apparaît nettement que la quantité d'urochrome éliminée en 24 heures n'est guère plus élevée dans les urines « diazoréactionnantes » que dans les urines dites normales. Mais si l'on considère la concentration de ce corps dans l'urine, on voit alors que pour un même volume la quantité d'urochrome est trois ou quatre fois plus élevée dans les urines des sujets atteints de tuberculose, de rougeole ou de fièvre typhoïde. Nous n'avons jamais rencontré une teneur proportionnellement aussi forte dans les urines dites normales. De plus, si on tient compte du régime que suivent ces malades, qui est généralement un régime lacté ou lacto-végétarien, il semble que l'urochrome doive être un indice pathologique, tellement alors sa présence est anormale.

On voit également qu'il faut relativement peu d'hypo-sulfite pour doser la partie du corps actif qui précipite par l'acétate cuivrique après la réduction par l'hydrogène sulfuré bien que la diazoréaction soit trois fois plus intense sur ce corps avant le traitement par l'hydrogène sulfuré.

Nous n'avons pas pu déterminer exactement quelle pouvait être la cause de cette disparition du facteur « diazoréactionnant » et cependant on serait tenté de croire que la réduction en détruit à elle seule une grande partie si nous ne savions qu'après oxydation ménagée le pouvoir « diazoréactionnant » d'une solution urochromique augmente fortement.

Quoi qu'il en soit, ces dosages confirment les résultats que nous avons déjà obtenus et montrent que dans

toutes ces urines qui donnent la réaction il existe :

1° Un corps anormal que nous avons appelé « Oxy-urochrome » qui ne répond pas aux réactions de l'urochromogène Weiss qui serait, lui, un corps moins oxydé que l'urochrome (62).

2° Un constituant de l'urine : l'urochrome dont la teneur, évaluée au litre, est proportionnellement beaucoup plus élevée que dans les urines normales et qui à lui seul peut donner la réaction.

XV. — APPLICATIONS DE LA DIAZORÉACTION A LA CLINIQUE

La simplicité de la réaction qu'Ehrlich avait trouvé en 1882 et appliqué aux diagnostics de la fièvre typhoïde et de la tuberculose, attira immédiatement l'attention de nombreux cliniciens qui virent là un moyen simple et pratique d'identification de ces maladies.

Aussi il n'est pas étonnant de voir que certaines maladies passaient pour donner une réaction positive ou négative suivant les auteurs qui les avaient observées. Pour les uns son apparition dans les urines demeure un présage grave dans n'importe quelle maladie, pour les autres c'est une réaction banale, fréquente dans les urines des fiévreux et qui ne peut avoir aucune valeur clinique.

Au cours de nos recherches limitées malheureusement par le petit nombre de ces maladies que nous avons pu rencontrer, nous nous sommes rendu compte que sans avoir une valeur diagnostique sûre, la positivité de la diazoréaction dans les urines peut cependant avoir une certaine valeur pronostique et aider utilement à la clinique. Elle n'apparaît que dans des maladies net-

tement déterminées, et au cours de ces affections, bien souvent à des périodes de début ou de recrudescence. Grâce à l'appui bienveillant des médecins des différents hôpitaux qui ont bien voulu nous aider dans notre travail, nous avons pu conclure que sans être toujours un présage grave, puisqu'elle est positive au début de la rougeole, elle demeure cependant dans la fièvre typhoïde et dans la tuberculose un symptôme très net de poussée ou de rechute quand la maladie suit son cours normal. Chez les noirs, sa valeur pronostique serait toute différente, car la réaction se rencontre rarement dans l'urine de ces malades, sauf au cours de la fièvre typhoïde (Williams) (59).

Tuberculose. — Les avis les plus divers furent émis sur la présence de la diazoréaction dans les urines des tuberculeux. Les uns ont prétendu la trouver d'une façon constante, les autres à certaines périodes de la maladie, d'autres enfin dans des formes de tuberculose nettement définies.

C'est ainsi que Képhalinos (31) prétend la rencontrer dans toutes les urines des enfants atteints de tuberculose, tandis que Van Nissen (57) en étudiant plus sérieusement la question conclut qu'elle n'est positive que dans la tuberculose pulmonaire et dans des formes qu'il divise en deux groupes.

Dans le premier qui réunit les cas de pneumonie caséuse avec poussée de tuberculose miliaire, la diazoréaction apparaît à des intervalles plus ou moins éloignés, pour s'établir définitivement avant la mort ; dans

le second groupe qui embrasse le cas de la tuberculose miliaire, la diazoréaction fait défaut tant que l'affection revêt la forme d'une bronchite ou d'une bronchopneumonie, puis elle apparaît brusquement très intense, et se maintient jusqu'à la mort.

De plus il a généralement rencontré une diazoréaction positive dans la méningite tuberculeuse alors qu'elle fait toujours défaut dans la méningite simple ou dans la méningite cérébro-spinale.

Continuant le travail, Dolgoff (12) la rencontra d'une façon constante dans la tuberculose ganglionnaire, la péritonite tuberculeuse, la pleurésie purulente et la granulie. Il vit aussi qu'elle pouvait faire défaut dans la tuberculose pulmonaire et dans les exsudats séreux.

Nous avons suivi près de 400 tuberculeux atteints de forme de tuberculose les plus variées. Dans certaines urines la diazoréaction était positive, dans d'autres négatives.

Elle fut toujours négative chez les tuberculeux qui n'avaient pas d'affection aiguë, mais devenait immédiatement positive sur tous ces sujets dès que la maladie était en recrudescence ou en poussée (Fait qui confirme les dires de Ph. Rivier).

Elle apparaît brusquement sans que l'état du malade ne se transforme, devient intensive après 24 ou 48 heures tandis qu'apparaissent les symptômes de la poussée et que la fièvre s'élève. La diazoréaction demeure alors positive, en rapport avec la courbe thermique et disparaît petit à petit, généralement avant que la température ne soit redevenue normale. Dans

certain cas elle apparaît dans les urines, s'intensifie lentement, demeure positive, tandis que la température du malade ne s'élève pas. C'est alors un mauvais présage car on voit la maladie évoluer brusquement et se terminer généralement par une issue fatale quelques jours plus tard.

Bien que la présence de la diazoréaction dans ces urines soit un présage grave on ne doit pourtant pas conclure qu'un malade dont les urines ne donnent pas la réaction n'est pas gravement atteint.

Nous avons rencontré 14 tuberculeux sur 420 dont les urines ont donné une réaction négative jusqu'à la mort.

La réaction quand elle est positive doit faire penser à une recrudescence de la maladie, rester un présage grave, comme l'ont montré A. Blad-Michaelis-Videbech (20) tandis que son absence ne doit pas indiquer que le malade n'a aucune lésion grave, même aiguë.

Fièvre typhoïde. — Comme dans la tuberculose, les opinions des auteurs sont très différentes sur la valeur de la diazoréaction dans les urines. Les uns lui attribuent une valeur absolue, les autres aucune, mais tous sont cependant d'accord pour reconnaître qu'elle apparaît dans environ 95 cas sur 100 (Dolgoft (12), Lapschine (32), Ch. Lyman Greene, Wrigt (58) et même qu'elle est toujours positive (Rossi (50), Denigès (10).

Nous avons examiné successivement l'urine de 173 malades atteints de typhoïde, paratyphoïde A ou B. Nous n'avons jamais pu déterminer exactement l'apparition de la réaction dans les urines de ces malades qui en-

trent rarement à l'hôpital dès le début de la maladie : elle apparaîtrait d'après Gérard le 2^e jour au soir, plus généralement le 3-4-5 ou 6^e jour.

Dès l'entrée de ces malades à l'hôpital la diazoréaction fut toujours positive et en rapport avec le séro-diagnostic de Widal positif. Sauf trois cas où la réaction fut négative et le séro-diagnostic positif.

L'urine avait alors une densité exagérée, un très petit volume, et était très chargée en indoxyle et en sulfo-conjugés. Très nette dans le premier septenaire, la réaction disparut généralement au début et au cours du second, plus rarement au cours du troisième septenaire, s'affaiblissant dès la période d'oscillations descendantes en même temps que le volume diminuait. Sa disparition au cours de la période de la dothiënenterie semble permettre de prévoir l'apparition prochaine de la période à grandes oscillations thermiques au cours de laquelle la diazoréaction est toujours négative. Après le 3^e septenaire la réapparition de la diazoréaction dans ces urines a toujours été de pair avec une période de recrudescence qu'elle ne prévient que rarement. La diazoréaction dure alors autant que dure la rechute puis disparaît de nouveau. Sa persistance, son accentuation malgré la chute de la température, doivent être considérées comme un pronostic grave qui à douze reprises nous a présagé des rechutes très sérieuses dont quatre furent mortelles.

Rougeole. — Les auteurs qui se sont occupés de la diazoréaction au cours de la rougeole sont peu nom-

breux, mais tous d'accord pour reconnaître la positivité de la diazoréaction dans la période fébrile.

Nous avons constaté que la diazoréaction apparaît déjà quelques fois pendant la période prodromique un ou deux jours avant l'éruption, le plus souvent en même temps que l'éruption, rarement deux ou trois jours après. Elle demeure toujours positive 3 à 8 jours, en moyenne cinq jours et dépasse généralement de quelques jours le maximum de la fièvre et de l'éruption. Elle est ordinairement très accusée au début, et disparaît progressivement sans présenter de relations étroites avec la fièvre.

Sa constance dans la rougeole fait que cette réaction peut aider utilement la clinique dans le cas où le diagnostic différentiel d'avec la roséole ou la miliaire serait difficile, puisque dans ces deux dernières maladies la diazoréaction est négative.

Scarlatine. — La diazoréaction dans la scarlatine est tout à fait inconstante si on en croit Nissen (57), Lemaire (34), qui l'ont rencontrée dans onze cas sur 23, 8 fois le premier jour de la maladie, trois fois le second jour seulement.

Von Bogaert reprenant la question, la rencontra 5 fois positive sur 30, et Otto Hesse (26) d'une façon constante dans toutes les urines de malades atteints de scarlatine, alors qu'elle était négative dans les éruptions scarlatiniformes. Nous avons examiné 52 urines de sujets atteints de cette maladie, dans aucun cas nous n'avons obtenu de coloration rouge ou de mousse spécifique.

Grippe. — Après avoir examiné une vingtaine d'urines de malades atteints de grippe, à forme pulmonaire ou intestinale, nous n'avons jamais rencontré de diazoréaction positive.

Embarras gastrique fébrile. — La diazoréaction a pu bien souvent nous permettre de distinguer de simples embarras gastriques fébriles d'avec la fièvre typhoïde, où la réaction est positive. Le séro-diagnostic confirma d'une manière constante le résultat.

Typhus exanthématique. — D'après Lapschine, Boschi (4), Ghelfi (22), la diazoréaction serait constante dans le typhus exanthématique et serait toujours positive dans les urines, qu'on les examinât au début ou à la fin de la maladie.

Peste bubonique. — Sabrazes (53) en étudiant la peste bubonique rencontra d'une façon constante la diazoréaction positive dans les urines de ces malades. Elle durerait tout le temps de la maladie et disparaîtrait seulement en même temps qu'elle.

L'actinomyose et l'ostéomyélite fébrile donneraient également d'après Denigès une réaction positive.

Malaria, béribéri, scorbut, lèpre, ankylostomiase. — S'attaquant alors à ces maladies diverses et parasitaires, Sabrazès (53) montra que la diazoréaction demeurerait entièrement négative pendant tout le cours de l'infection.

Fièvre jaune. — La fièvre jaune ne provoquerait pas non plus l'apparition du corps « diazoréactionnant » dans les urines. Diatz Albertini (11) qui en a examiné 1892 cas ne l'a jamais rencontrée.

CONCLUSIONS

Après avoir exposé la diversité des avis qui ont été émis sur la diazoréaction d'Ehrlich depuis 1882, nous avons montré que cette réaction n'était pas suffisamment définie pour être attribuée à un seul corps ou à un groupement chimique nettement déterminé.

Les méthodes indiquées pour effectuer la diazoréaction étant nombreuses nous avons exposé la technique opératoire que nous avons suivie et les raisons qui nous l'ont fait choisir, puis montré que si les urines considérées comme normales donnent des réactions allant du jaune à l'orangé, par contre les teintes nettement rouge carmin ou vermillon ne se produisent que dans les urines pathologiques ou à la suite de l'ingestion de certains médicaments.

Nous avons alors nettement défini ce que nous entendons par diazoréaction d'Ehrlich positive, éliminant par là même toutes les causes d'erreur dues aux médicaments ingérés ou aux teintes plus ou moins accentuées que donnent certaines urines pathologiques sous l'influence des réactifs.

La réaction étant ainsi bien définie, nous avons tenté

l'isolement du corps qui la provoque, montré que son extraction est pratiquement impossible par solubilisation et que la précipitation ne permet pas de l'isoler.

Grâce à une technique opératoire spéciale il nous a été possible d'obtenir des extraits urinaires débarrassés de la plus grande partie des constituants connus de l'urine, et nous avons alors obtenu un résidu qui contenait la majeure partie du corps qui régit et qui donnait toutes les réactions de l'urochrome.

Nous avons alors montré que la diazoréaction était due :

a) A un corps analogue à l'urochrome, et donnant toutes les réactions de la thio-urochrome de Dombrowski.

b) A un corps plus oxydé que l'urochrome, donnant les mêmes réactions, ayant également un noyau pyrrolique et non hémopyrrolique, mais ne précipitant pas par la solution d'acétate de cuivre. Nous avons ensuite montré combien il est facile de passer par oxydation de l'urochrome à l'oxy-urochrome, par hydrogénation de l'oxy-urochrome à l'urochrome et comment il est possible de les doser séparément.

La série de dosage que nous avons faite montre bien que :

a) L'élimination de l'urochrome n'est guère plus élevée en 24 heures dans les urines des sujets sains que

dans celles des malades atteints de tuberculose, de rougeole ou de fièvre typhoïde.

b) Que la proportion d'urochrome contenue dans un même volume d'urine est cependant plus élevée dans l'urine des sujets qui donnent la diazoréaction d'Ehrlich que dans les urines dites normales qui sont beaucoup moins concentrées.

c) Que toutes les urines qui donnent la diazoréaction contiennent à côté de l'urochrome le corps dit « oxy-urochrome » qui est bien plus apte à copuler avec le sulfodiazobenzol.

Au point de vue clinique la réaction telle que nous l'avons définie semble pouvoir être d'un appui important au cours de la tuberculose, de la rougeole et de la fièvre typhoïde, dont elle indique généralement la marche et les recrudescences. Malheureusement elle ne peut servir à identifier ces maladies d'une façon certaine, mais simplement à en confirmer le diagnostic.

Vu, le Doyen,
H. GAUTIER.

Vu, le Président,
GRIMBERT.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris
APPELL.

BIBLIOGRAPHIE

1. BONNAMOUR et IMBERT. — Sur une nouvelle méthode de recherche de l'acétone dans les urines (*Presse Médicale*, n° 14, 1913).

2. BONIN et LARTIGAUULT. — *Gazette hebd. des sc. méd. de Bordeaux*, 12 août 1914.

3. BOZZI. — Contributo allo studio d'una [nuova tecnica per la diazoreazione d'Ehrlich (*Revista critica de clinica medica*, n° 7, 15 février 1913).

4. BOSCHI. — La diazoreactione nelle urine. Communication au 14^e congrès médecine. (*D'après Tomasi*, n° 3, 20 février 1907).

5. BONNES. — *Bulletin général de thérapeutique*, 23 mars 1901.

6. COLLET. — Diagnostic des fièvres éruptives à l'aide de la diazoréaction d'Ehrlich (*Lyon Médical*, p. 2016, 1907).

7. CLÉMENS. — *Congrès de pathologie interne de Leipzig*, 1904.

8. CAVAUDAN. — *Thèse faculté médecine*, Paris 1914.

9. CLÉMENS. — Causes de la diazoréaction d'Ehrlich (*Deutsche Archive für Klinische medicin*, p. 1015, 1899).

10. DENIGÈS. — Diazoréaction Ehrlich, (*Chimie Analytique*, p. 1215, 1913).

11. DIATZ ALBERTINI. — *Revista medica Cubana*, n° 5, mai 1911.

12. DOLGOFF. — La diazoréaction dans la fièvre typhoïde et autres maladies (*Jouguo-Rouss. Med. Gaz.*, n° 19, 1896).

13. DOMBROWSKI. — Sur la nature de la coloration fondamentale des urines (*Bull. Ac. Sc. de Cracovie*, octobre 1907, p. 777 à 836).

14. DOMBROWSKI. — Sur une méthode de dosage de la matière colorante fondamentale des urines (*Journal physiologie et pathologie générale*, p. 819 à 824, 1908).

15. DMITRENKO. — Médicaments et diazoréaction d'Ehrlich (*Arch. gén. méd.*, n° 20, 1906).

16. EHRLICH. — Sur un corps susceptible de diazoréaction ner dans l'urine (*Zeitschrift. fur Klinische Medizin*, mai 1882).

17. ENGELAND. — Sur la diazoréaction. Wiener medical Wochenschrift (d'après *Pharmaceutische Zeitung*, n° 31, p. 717, 1908).

18. FURTH. — *Biochemische Zeitschrift* ; XCVI, p. 269, 1919.

19. FERL. — Sur une nouvelle méthode de la diazoréaction d'Ehrlich (*Pharmaceutische Zeitung. Central halle*, p. 131, 1913).

20. GÉRARD. — Diazoréaction d'Ehrlich, p. 281, 1903).

21. GEBHARDT. — *Thèse faculté Médecine*, Paris, 1901. Index bibliographique, 521.

22. GHELFI. — *Gazetta siciliana de medica et chirurgica*, p. 892, 11 avril 1907.

23. GUTH E. — La diazoréaction dans la tuberculose (*Beitrage uber Klinische Tuberk*, 45, p. 198 à 205, 1920).

24. GUILLAUMIN. — *Journal pharmacie et chimie*, t. I, p. 339, 1920.

26. HESS OTTO. — Applications cliniques de la diazoréaction (*Medezin Klin*, n° 8, 1913).

27. HERMANN et SACHS, — Sur une nouvelle méthode d'extraction du corps diazoréactionnant des urines de malades atteints de tuberculose. (*Zeitschrift. fur physiologische chimie*, CXIV, p. 79 à 87, 1921).

28 d°. — Caractérisation du colorant obtenu dans la diazoréaction d'Ehrlich par combinaison avec le dichloro-azoben-

zène (*Zeitschrift für physiologische chemie*, CXIV, p. 88 à 94, 1921).

29. ISNARD. — Applications de la benzaldehyde réaction à la clinique (*Compte rendu Société de biologie*, 11 janvier 1923).

30. JACKST. — *Compte rendu au 14^e Congrès Médecine*, 1907.

31. KEPHALINOS. — Application de la diazoréaction au diagnostic de la tuberculose (*Médecine Moderne*, août 1903).

32. LAPSCHINE. — Recherche sur le corps qui donne la diazoréaction dans les urines (*Wratchebnia Zapiski*, n^o 3, 27 février 1896).

33. CHARLES LYMANN GREENE. — Des moyens adjuvants pour le diagnostic de la fièvre typhoïde (*Medical record*, 14 novembre 1896, p. 697).

34. LEMAIRE — Diagnostic des éruptions médicamenteuses, rubéoliques et scarlatineuses par la diazoréaction d'Ehrlich (*Gazette hebd. des Sc. Méd. de Bordeaux*, n^o 17, p. 197),

35. SAMUEL LEWINSON. — Diazoréaction dans les urines (*Medical record*, n^o 18, p. 95, 1911).

36. LÖEPPEL et OPPENHEIM. — Extraction du corps qui donne la diazoréaction à l'aide du noir animal (*Gazette des hôpitaux*, 25 mai 1904).

37. MAILLARD. — Méthode d'extraction et d'identification du corps qui provoque la diazoréaction (*Compte rendu Société de biologie*, p. 1421, 1903).

38. MASOIN. — Sur la diazoréaction dans les urines (*Bul. Ac. roy. Méd. Belg.*, 9 janvier 1904).

39. MASOIN. — Sur la diazoréaction dans les urines (*Bulletin acad. roy. méd. Belge.*, p. 982 à 985, 1919).

40. MICHALOWSKA SOPHIE. — Applications cliniques de la diazoréaction. Sa valeur clinique (*Thèse Médecine-Lausanne*, 1903).

41. MLADENDORFF. — *Bulletin Société de chimie*, 16 novembre 1912.

42. MONFET. — Recherche sur le corps qui provoque la diazoréaction dans les urines (*Compte rendu Société de biologie*, 7 novembre 1903).

43. MONFET. — Recherche sur le corps qui provoque la diazoréaction dans les urines (*Compte rendu Société de biologie*, p. 1973, 18 novembre 1903).

44. MUELLER JUSTIN. — Sur un nouveau pigment de l'urine (*Journal de pharmacie et de chimie*, 13 octobre 1907).

45. MUELLER. — Sur un nouveau pigment de l'urine normale (*Journal de pharmacie et de chimie*, juin 1913).

46. NICOLA. — Généralités sur la diazoréaction d'Ehrlich. (*Jour. del roy. acad. méd. Torino*, p. 83, 1904).

47. ORCHEIM. — *Biochemische Zeitung*, p. 123 à 128, 1918.

48. PELISSIÈRE. — Tyrosine et tyrosamines, réactions spécifiques (*Union pharmaceutique*, XVIII, octobre 1914).

50. ROSSI. — Sui valore clinica della contemporanea presenza nelle urine dei tifosi di acetico e della diazoreactione (*Nuova rivista clinico terapeutica*, p. 2342, 1913).

51. RONCHÈSE. — Recherche et dosage de l'acide B oxybutyrique (*Guide pour analyse des urines*, 1922).

53. SÁBRAZÈS. — Diazoréaction dans les maladies des pays chauds (*Munchner medical Woche*, 22 avril 1905 et *Centralblatt für Klinische medizin*, n° 11, p. 128, 1904).

54. SCARPITTI. — Sulla diazoreactione d'Ehrlich (*Médecine Italienne*, n° 33, avril 1905).

55. SONDI. — Sur un procédé plus simple de la diazoréaction d'Ehrlich (*Gaz. hebd. des Sc. méd. de Bordeaux*, n° 37, 1905).

56. VON BOGAERT. — *Deutsche medizinische zeitung*, Sc. 4, 1904,

57. VAN NISSEN. — Valeur diagnostique de la diazoréaction chez les enfants (*Jahrbuch für Kinderheilk*, v. 38, p. 146, 1894).

58. WRIGHT. — La diazoréaction dans la fièvre typhoïde (*Britisch. med. Journal*, août 1899).

59. WILLIAMS. — Recherche sur la diazoréaction (*Medical record*, 23 mars 1909).

60. WEISS. — Observations sur la diazoréaction d'Ehrlich dans la tuberculose pulmonaire (*Wien Klinische Wochenschrift*, n° 33, 1907).

61. WEISS. — La diazoréaction est donnée par un corps voisin de l'urochrome (*Biochemische zeitung*, p. 30 et p. 333, 1911).

62. WEISS. — Sur un nouveau pigment de l'urine moins oxydé que l'urochrome (*Biochemische zeitung*, 133, p. 331, volume 49, 1922).

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
I. — Historique	9
II. — Technique employée.....	22
III. — Diazoréaction dans les urines dites normales..	24
IV. — Coloration de certaines urines par diazotation..	26
V. — Caractères d'une diazoréaction positive.....	32
VI. — Action des éléments des différents corps chimiques sur les urines positives	35
VII. — Tentatives d'extraction - Solubilisation - Précipitation.....	38
VIII. — Technique d'isolement.....	39
IX. — Identification	52
X. — Dosages.....	63
XI. — Applications de la diazoréaction d'Ehrlich à la clinique	72
XII. — Conclusions	81
Bibliographie	85

Saint-Amand (Cher). — Imp. A. CLERC
